

(19) 国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117717604 A

(43) 申请公布日 2024.03.19

(21) 申请号 202311226685.7

A61K 39/395 (2006.01)

(22) 申请日 2017.07.19

A61P 35/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/363,982 2016.07.19 US

(62) 分案原申请数据

201780055824.0 2017.07.19

(71) 申请人 梯瓦制药澳大利亚股份有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

(72) 发明人 S·L·珀古 D·S·小威尔逊

T·塔尤拉

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

专利代理人 刘晓东

(51) Int.Cl.

A61K 38/21 (2006.01)

权利要求书3页 说明书56页

序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称

抗CD47联合治疗

(57) 摘要

本发明提供用于治疗受试者中的肿瘤的组合疗法。该组合包括两个要素。第一个要素是包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN)的多肽构建体，所述抗体与肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原结合并包含功能性Fc区。第二个要素是CD47拮抗剂，其抑制CD47与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。

1. 多肽构建体和CD47拮抗剂在制备用于治疗受试者中的肿瘤的药物中的用途,其中所述多肽构建体包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN),所述抗体结合在肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原,并且包含功能性Fc区,并且所述CD47拮抗剂抑制CD47与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。

2. 如权利要求1所述的用途,其中减弱的I型IFN通过肽键与抗体连接。

3. 如权利要求1所述的用途,其中减弱的I型IFN直接地或通过长度为1-20个氨基酸的接头与抗体连接。

4. 如权利要求1所述的用途,其中所述肽或多肽信号传导配体与所述抗体的轻链或重链恒定区的C末端连接。

5. 如权利要求1所述的用途,其中减弱的I型IFN是减弱的IFN $\alpha$ 。

6. 如权利要求5所述的用途,其中IFN $\alpha$ 的氨基酸序列选自SEQ ID NOs 1至3、80至90、391和392,并且其中IFN $\alpha$ 包含减弱IFN $\alpha$ 活性的至少一个氨基酸取代或缺失。

7. 如权利要求5所述的用途,其中减弱的IFN $\alpha$ 是减弱的IFN $\alpha$ 2b。

8. 如权利要求7所述的用途,其中减弱的IFN $\alpha$ 2b具有相对于SEQ ID NO:3包含至少一个选自下述的氨基酸取代或缺失的序列:L15A,R22A,R23A,S25A,L26A,F27A,L30A,L30V,K31A,D32A,R33A,R33K,R33Q,H34A,Q40A,D114R,L117A,R120A,R120E,R125A,R125E,K131A,E132A,K133A,K134A,M148A,R149A,S152A,L153A,N156A,(L30A,H57Y,E58N和Q61S),(R33A,H57Y,E58N和Q61S),(M148A,H57Y,E58N和Q61S),(L153A,H57Y,E58N和Q61S),(R144A,H57Y,E58N和Q61S),(N65A,L80A,Y85A和Y89A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和D114A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和L117A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和R120A),(Y85A,Y89A和D114A),(D114A和R120A),(L117A和R120A),(L117A,R120A和K121A),(R120A和K121A),(R120E和K121E),第144位的R取代为A、D、E、G、H、I、K、L、N、Q、S、T、V或Y,第145的A取代为D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V或Y,缺失残基L161至E165及其组合。

9. 如权利要求7或8所述的用途,其中减弱的IFN $\alpha$ 2b是非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b。

10. 如权利要求9所述的用途,其中非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b的T106缺失或被除T以外的氨基酸取代。

11. 如权利要求10所述的用途,其中非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b的T106被A取代。

12. 如权利要求10所述的用途,其中缺失了非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b的T106。

13. 如权利要求7或8所述的用途,其中减弱的IFN $\alpha$ 2b的序列是SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:536。

14. 如权利要求1所述的用途,其中所述细胞表面相关抗原选自CD38,CD138,RANK配体,HM1.24,CD56,CS1,CD20,CD74,IL-6R,Blys(BAFF),BCMA,Kininogen,beta2微球蛋白,FGFR3,ICAM-1,matriptase,CD52,EGFR,GM2, $\alpha$ 4整合素,IFG-1R,KIR,CD3,CD4,CD8,CD24,CD30,CD37,CD44,CD69,CD71,CD79,CD83,CD86,CD96,HLA,PD-1,ICOS,CD33,CD115,CD11c,CD19,CD52,CD14,FSP1,FAP,PDGFR $\alpha$ ,PDGFR $\beta$ ,ASGR1,ASGR2,FSP1,LyPD3,RTI140/Ti- $\alpha$ ,HTI56,VEGF受体,CD241,RCHE基因的产物,CD117(c-kit),CD71(转铁蛋白受体),CD36(血小板反应蛋白受体),CD34,CD45RO,CD45RA,CD115,CD168,CD235,CD236,CD237,CD238,CD239,CD240,TROP2,CD70,CCR2,HER2,EGFR和CCR3。

15. 如权利要求1所述的用途,其中所述细胞表面相关抗原选自CD38,CD138,EpCAM,

TROP2, CD19, CD20, CD79b, CD22和CD52。

16. 如权利要求15所述的用途,其中细胞表面相关抗原是CD38。

17. 如权利要求16所述的用途,其中抗体的V<sub>H</sub>序列选自SEQ ID Nos:342、344、346、504和511。

18. 如权利要求16或17所述的用途,其中抗体的V<sub>L</sub>序列选自SEQ ID Nos:341、343、345、505、512、535和538。

19. 如权利要求1所述的用途,其中多肽构建体的序列是SEQ ID NO:508和SEQ ID NO:507或SEQ ID NO:532和SEQ ID NO:533。

20. 如权利要求1所述的用途,其中CD47拮抗剂结合CD47并抑制其与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。

21. 如权利要求20所述的用途,其中CD47拮抗剂是抗CD47抗体。

22. 如权利要求21所述的用途,其中抗CD47抗体是人抗体或人源化单克隆抗体。

23. 如权利要求21或22所述的用途,其中抗CD47抗体是非糖基化的。

24. 如权利要求21所述的用途,其中轻链的序列是SEQ ID NO:509,重链的序列是SEQ ID NO:510或SEQ ID NO:534。

25. 如权利要求20所述的用途,其中CD47拮抗剂是抗SIRP $\alpha$ 抗体。

26. 如权利要求25所述的用途,其中抗SIRP $\alpha$ 抗体是人抗体或人源化单克隆抗体。

27. 如权利要求20所述的用途,其中CD47拮抗剂是SIRP $\alpha$ 的细胞外结构域。

28. 如权利要求27所述的用途,其中SIRP $\alpha$ 的细胞外结构域与Fc连接。

29. 如权利要求1所述的用途,其中所述药物适于将所述多肽构建体与所述CD47拮抗剂顺序或同时给药。

30. 根据权利要求1所述的用途,其中肿瘤选自多发性骨髓瘤或非霍奇金淋巴瘤。

31. 一种组合物,其混合包含(i)多肽构建体,所述多肽构建体包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN),所述抗体结合在肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原并且包含功能性Fc区,和(ii)CD47拮抗剂,其抑制CD47与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。

32. 如权利要求31所述的组合物,其中所述多肽构建体和/或所述CD47拮抗剂是如权利要求2-29中任一项所定义的。

33. 如权利要求31所述的组合物,其中所述组合物用于治疗肿瘤。

34. 如权利要求33所述的组合物,其中所述肿瘤选自多发性骨髓瘤或非霍奇金淋巴瘤。

35. 多肽构建体在制备用于与CD47拮抗剂一起治疗受试者中的肿瘤的药物中的用途,其中所述多肽构建体包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN),所述抗体结合在肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原,并且包含功能性Fc区,并且所述CD47拮抗剂抑制CD47与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。

36. CD47拮抗剂在制备用于与多肽构建体一起治疗受试者中的肿瘤的药物中的用途,其中所述多肽构建体包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN),所述抗体结合在肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原,并且包含功能性Fc区,并且所述CD47拮抗剂抑制CD47与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。

37. 如权利要求35或36所述的用途,其中所述多肽构建体和所述CD47拮抗剂是如权利要求2-29中任一项所定义的。

38. 根据权利要求35或36所述的用途,其中所述肿瘤选自多发性骨髓瘤或非霍奇金淋巴瘤。

39. 多肽构建体和CD47拮抗剂在制备用于治疗受试者中的非小细胞肺癌的药物中的用途,其中所述多肽构建体包含SEQ ID NO:529和530,并且其中所述CD47拮抗剂是抗-CD47抗体,其包含SEQ ID NO:515的轻链序列和SEQ ID NO:516的重链序列。

40. 多肽构建体在制备用于治疗受试者中的非小细胞肺癌的药物中的用途,其中所述多肽构建体包含SEQ ID NO:529和530,并且其中所述药物与CD47拮抗剂组合使用,其中所述CD47拮抗剂是包含SEQ ID NO:515的轻链序列和SEQ ID NO:516的重链序列的抗CD47抗体。

41. CD47拮抗剂在制备用于治疗受试者中的非小细胞肺癌的药物中的用途,其中所述CD47拮抗剂是包含SEQ ID NO:515的轻链序列和SEQ ID NO:516的重链序列的抗-CD47抗体,并且其中所述药物与包含SEQ ID NO:529和530的多肽构建体组合使用。

## 抗CD47联合治疗

[0001] 本申请是申请日为2017年7月19日、发明名称为“抗CD47联合治疗”的中国发明专利申请No.201780055824.0的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请要求2016年7月19日提交的美国临时专利申请No.62/363,982的优先权，其全部公开内容通过交叉引用并入本文。

### 发明领域

[0004] 本发明涉及用于治疗肿瘤的组合疗法。该组合包含第一和第二部分，其中两个部分共同起作用以提供增强的抗肿瘤反应。第一部分是多肽构建体，其包含与抗体连接的减弱的I型干扰素，所述抗体与肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原结合，第二部分是减少CD47信号传导的药剂。

### 背景技术

[0005] 已经描述了许多肽和多肽分子通过与细胞表面上的受体相互作用而起作用，从而刺激、抑制或以其他方式调节生物反应，通常涉及携带所述受体的细胞内的信号转导途径。此类分子的实例包括肽和多肽激素，细胞因子，趋化因子，生长因子，凋亡诱导因子等。这些分子可以是可溶的，或可以附着在另一个细胞的表面上。

[0006] 由于这些分子的生物活性，一些分子具有作为治疗剂的潜在用途。几种肽或多肽分子已被管理机构批准作为治疗产品，包括例如人生长激素、胰岛素、干扰素IFN $\alpha$ 2b、IFN $\alpha$ 2a、IFN $\beta$ 、IFN $\gamma$ 、促红细胞生成素、G-CSF和GM-CSF。许多这些和其他肽已经在治疗应用中显示出潜力，但是当施用于人类患者时也表现出毒性。毒性的一个原因是大多数这些分子触发多种细胞上的受体，包括介导所需治疗效果的细胞以外的细胞。例如，当IFN $\alpha$ 2b用于治疗多发性骨髓瘤时，其效用至少部分地在于其与骨髓瘤细胞上的I型干扰素受体的结合，这反过来又引发减少的增殖并因此限制疾病进展。然而，不幸的是，该IFN还与体内许多其他正常细胞结合，引发多种其他细胞反应，这些反应在治疗情形中是不希望的，其中一些是有害的（例如流感样症状，中性粒细胞减少症，抑郁症）。肽的这种“脱靶”活性的结果是许多肽不适合作为候选药物。在这种情况下，“脱靶活性”是指对肽的天然受体的活性，但是在除介导治疗有益效果的细胞之外的细胞的表面上。

[0007] 尽管一些肽（例如IFN $\alpha$ 2b）被批准用于治疗医学病症，但由于它们的“脱靶”生物活性，它们的耐受性差。脱靶活性和相关的差耐受性还意味着这些基于肽的药物中的一些不能以足够高的剂量施用以对介导治疗效果的靶细胞产生最佳治疗效果。

[0008] 类似地，自1980年代中期以来已知干扰素，特别是IFN $\alpha$ ，能够增加细胞凋亡并减少某些癌细胞的增殖。这些生物学活性由癌细胞表面上的I型干扰素受体介导，当受到刺激时，它们启动各种信号转导途径，导致增殖减少和/或终末分化或凋亡的诱导。IFN $\alpha$ 已被FDA批准用于治疗多种癌症，包括黑素瘤，肾细胞癌，B细胞淋巴瘤，多发性骨髓瘤，慢性髓性白血病（CML）和毛细胞白血病。IFN $\alpha$ 对肿瘤细胞的“直接”作用是由IFN $\alpha$ 与那些细胞上的I型

IFN受体的直接结合并刺激细胞凋亡、终末分化或减少的增殖所介导的。IFN $\alpha$ 对非癌细胞的一种“间接”作用是刺激免疫系统,这可通过使免疫系统排斥肿瘤而产生额外的抗癌作用。

[0009] 不幸的是,I型干扰素受体也存在于大多数非癌细胞上。IFN $\alpha$ 对非癌细胞上的该受体的激活导致许多促炎细胞因子和趋化因子的表达,导致毒性。这种毒性防止了IFN $\alpha$ 以对癌细胞发挥最大抗增殖和促凋亡活性的水平给予受试者。

[0010] Ozzello等人(Breast Cancer Research and Treatment 25:265-76,1993)描述了将人IFN $\alpha$ 共价连接到肿瘤靶向抗体,从而将IFN $\alpha$ 的直接抑制活性定位到肿瘤,作为降低肿瘤生长速率的方法,并证明了这种缀合物在人癌症的异种移植模型中具有抗肿瘤活性。观察到的抗癌活性的机制归因于IFN $\alpha$ 对癌细胞的直接影响,因为在实验中使用的人IFN $\alpha$ 与小鼠I型IFN受体不会显著相互作用,这可能导致间接抗癌作用。然而,由于缺乏人IFN $\alpha$ 与鼠细胞的结合,作者无法评估抗体-IFN $\alpha$ 缀合物相对于游离IFN $\alpha$ 的毒性。这些作者使用化学方法将IFN $\alpha$ 连接到抗体上。

[0011] Alkan等人(Journal of Interferon Research,第4卷,第3期,第355-63页,1984)证明了将人IFN $\alpha$ 附着于与Epstein-Barr病毒(EBV)膜抗原(MA)结合的抗体上增加了其对表达EBV-MA抗原的细胞的抗增殖活性。这种增加的效力取决于靶细胞的抗原表达和抗体的结合特异性二者。测试的细胞系是癌细胞系QIMR-WIL,一种成髓细胞白血病。作者提出IFN $\alpha$ 与抗体的连接可用作癌症的治疗,因为它会减少肿瘤的生长。Alkan等人没有解决这些抗体-IFN $\alpha$ 缀合物与正常的抗原阴性细胞相互作用产生的潜在毒性。

[0012] 还已知抗体和IFN $\alpha$ 之间的连接可以通过制备融合蛋白构建体来实现。例如,IDEc(WO01/97844)公开了人IFN $\alpha$ 与靶向肿瘤抗原CD20的IgG的重链的C末端的直接融合。其他组已经公开了在IgG重链的C末端和IFN $\alpha$ 之间使用各种接头。例如,US 7,456,257公开了抗体重链恒定区的C末端可以通过序列(GGGGS) $n$ 的间插的富含丝氨酸-甘氨酸(S/G)接头与IFN $\alpha$ 连接,其中n可以是1、2或3,并且不管接头长度如何,融合蛋白构建体的IFN $\alpha$ 活性没有显著差异。

[0013] Morrison等人(US8,563,692;和Xuan C,Steward KK,Timmerman JM,Morrison SL,Targeted delivery of interferon- $\alpha$  via fusion to anti-CD20 results in potent antitumor activity against B-cell lymphoma.Blood 2010;115:2864-71)还公开了与靶向癌症的IgG抗体的重链的C末端连接的IFN $\alpha$ ,具有插入的S/G接头,并观察到IgG和接头与IFN $\alpha$ 的融合降低了IFN $\alpha$ 对在细胞表面上不表达相应抗原的细胞的活性。与作用于人细胞的人非融合蛋白IFN $\alpha$ (游离IFN $\alpha$ )相比,这些融合蛋白构建体的IFN活性降低是适度的,但似乎对于鼠IFN $\alpha$ 对鼠细胞上更显著。如Morrison等人和US 7,456,257所观察到的,将其融合至抗体C末端所导致的人IFN $\alpha$ 活性的降低是适度的,并且通常被认为是缺点,因为它降低了IFN的效力。例如,Rossi等人(Blood vol.114,No.18,pp3864-71)指出了这一缺点,他使用了一种替代策略,即将IFN $\alpha$ 连接到肿瘤靶向抗体的方式使得没有观察到IFN $\alpha$ 活性的损失。

[0014] 通常,现有技术教导使用强效的IFN并将该IFN靶向癌细胞。虽然这种方法导致IFN对抗癌细胞的活性增加,但它没有解决IFN对正常“脱靶”细胞的活性的问题。在上面提到的现有技术实例中,当暴露于不在其细胞表面上表达相应抗原的人细胞时,抗体-IgN $\alpha$ 融合蛋白的人IFN $\alpha$ 部分在很大程度上维持天然IFN $\alpha$ 活性。这种活性的维持可能导致由融合蛋白的

IFN $\alpha$ 部分激活非癌性正常(“脱靶”)细胞引起的毒性。

[0015] 因此,需要降低基于IFN的药物的“脱靶”活性,同时保持这些药物的“靶向”治疗效果。靶特异性活性的维持并且同时这些类型的治疗剂的非靶毒性的降低将为治疗上有用的肽产生更大的治疗浓度窗口。例如,希望以这样的形式使用人IFN $\alpha$ ,使得其活性可以针对癌细胞,同时使其对正常人细胞的影响最小化。理想地癌细胞上的I型干扰素受体被最大程度地刺激,而非癌细胞上的相同受体将经历最小的刺激。需要将人IFN $\alpha$ 靶向癌细胞,使得其对显示抗原的癌细胞的活性显著高于不显示该抗原的正常细胞。相同的逻辑适用于其他潜在治疗性的分子,例如其他细胞因子、肽和多肽激素,趋化因子,生长因子,凋亡诱导因子等。

[0016] 这一方法的逻辑已在W02013/059885,W02014/178820和W02016/065409中得到证实,其各自的公开内容通过交叉引用并入本文。

[0017] 巨噬细胞是存在于所有组织中的先天免疫细胞。在癌症中,巨噬细胞可以根据细胞信号而促进或抑制肿瘤生长。巨噬细胞亚群的表征揭示了至少2个亚组;一个亚组是M2巨噬细胞,其产生精氨酸酶并促进肿瘤生长,而另一个亚组是M1巨噬细胞,其产生一氧化二氮合成酶并介导肿瘤杀伤。巨噬细胞可以通过抗体依赖性机制杀死,例如抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或抗体非依赖性机制。

[0018] 与健康细胞不同,不需要的、老化的或垂死的细胞显示称为“吃我”(“eat-me”)信号(即“改变了的自身”的标志物或配体,其又可被吞噬细胞上的受体识别,例如嗜中性粒细胞,单核细胞和巨噬细胞。健康细胞可能会显示出“不要吃我”(“don't eat me”)的信号,这些信号会主动抑制吞噬作用;这些信号在垂死细胞中下调,以改变的构象存在,或者被“吃我”或促吞噬细胞信号的上调所超越。健康细胞上的细胞表面蛋白CD47及其与吞噬细胞受体即信号调节蛋白 $\alpha$ (SIRP $\alpha$ )的结合构成关键的“不要吃我”信号,其可以关闭由多种形式介导的吞噬,包括凋亡细胞清除和FcR介导的吞噬作用。阻断CD47介导的SIRP $\alpha$ 对吞噬细胞的参与,或敲除小鼠中CD47表达的丧失,可以导致活细胞和非老化红细胞的清除。对于那些也存在前吞噬细胞信号的细胞,阻断SIRP $\alpha$ 也可以吞噬那些通常不会被吞噬的靶。

[0019] CD47是广泛表达的跨膜糖蛋白,具有单个Ig样结构域和五个跨膜区。CD47作为SIRP $\alpha$ 的细胞配体起作用,其结合通过SIRP $\alpha$ 的NH2-末端V-样结构域介导。SIRP $\alpha$ 主要在骨髓细胞上表达,包括巨噬细胞,粒细胞,骨髓树突状细胞(DC),肥大细胞及其前体,包括造血干细胞。Lee等人(2007)J.Immunol.179:7741-7750;Hatherley等人(2007)J.B.C.282:14567-75讨论了SIRP $\alpha$ 上介导CD47结合的结构决定簇;Lee等人(2010)J.B.C.285:37953-63讨论了SIRP $\alpha$ 顺式二聚化在CD47结合中的作用。为了与CD47抑制正常细胞的吞噬作用保持一致,有证据表明它在迁移期之前和期间在造血干细胞(HSCs)和祖细胞上有短暂上调,并且这些细胞上的CD47水平决定了它们被体内吞噬的可能性。

[0020] 程序性细胞死亡(PCD)和吞噬细胞去除是生物体响应以除去受损、癌前期或感染细胞的方式之一。因此,在该生物体反应中存活的细胞(例如癌性细胞、慢性感染细胞等)已经设计了逃避PCD和吞噬细胞去除的方法。CD47,即“不要吃我”信号,在多种病变细胞、癌细胞和感染细胞上组成性上调,使这些细胞逃避吞噬作用。阻断一个细胞(例如癌细胞、感染细胞等)上的CD47和另一个细胞(例如吞噬细胞)上的SIRP $\alpha$ 之间的相互作用的抗CD47药剂抵消了CD47表达的增加并促进了癌细胞和/或感染细胞的吞噬作用。因此,抗CD47药剂可用于治疗和/或预防多种病症/病症。

## 发明内容

[0021] 在第一方面,本发明提供了用于治疗受试者中的肿瘤的组合疗法,该组合疗法包括施用(i)包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN)的多肽构建体,所述抗体结合肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原并且包含功能性Fc区,和(ii)CD47拮抗剂,其抑制CD47与SIRPa受体的相互作用。

[0022] 在本发明的组合疗法中,组分(i)和(ii)可以顺序或同时施用。

[0023] 在第二方面,本发明提供了治疗受试者中的肿瘤的方法,包括使用本发明的组合疗法。

[0024] 在第三方面,本发明提供了一种组合物,其包含混合的本发明组合疗法的组分(i)和(ii)。

[0025] 在第四方面,本发明提供了本发明的组合疗法的组分(i)和(ii)在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

## 附图说明

[0026] 图1:NCI-H929骨髓瘤异种移植模型中肿瘤体积的图,显示与同种型对照-减弱的IFN $\alpha$ 2b抗体(无关抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b)相比用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白治疗的结果。用抗CD-38-IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理在10只小鼠中的10只中消除了NCI-H929肿瘤,而对照非靶向减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的活性几乎没有效果。

[0027] 图2A:NCI-H929骨髓瘤异种移植物模型中肿瘤体积的图,显示与同种型对照-减弱的IFN $\alpha$ 2b抗体相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白治疗的结果。黑色箭头表示治疗的时间点,灰色箭头表示肿瘤取样的时间点,用于组织学分析。

[0028] 图2B:取自图2A中所示实验的肿瘤样品的组织学分析的评分图。与对照相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理的NCI-H929骨髓瘤异种移植物随着时间的推移表现出增加的外周肿瘤CD45+细胞募集。每个栏都代表单只鼠。在每个时间点测试两只小鼠。

[0029] 图3A:786-0肾癌异种移植物模型中肿瘤体积的图,显示了与媒介物施用相比用抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白治疗的结果。黑色箭头表示给药治疗的时间点,灰色箭头表示用于组织学分析的肿瘤取样的时间点。在该模型中,抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白对肿瘤抑制没有影响。

[0030] 图3B:取自图3A中所示实验的肿瘤样品的组织学分析评分图。与在NCI-H929骨髓瘤异种移植模型中用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白获得的结果相比,该模型中CD45+细胞的募集不太明显得多(图2A和2B)。每个条形代表单只小鼠。

[0031] 图4:提供了在NCI-H929骨髓瘤异种移植模型中使用这些不同的免疫细胞缺陷型小鼠品系的实验结果的图表。该图显示,与媒介物相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理后NCI-H929肿瘤体积。处理导致在SCID小鼠品系中10只动物有10只被治愈,在NOD-SCID品系中10只动物中有2只被治愈,以及在NSG品系中10只动物中有0只被治愈。

[0032] 图5:NCI-H929骨髓瘤异种移植物模型中肿瘤体积的图,显示了与单独媒介物或脂质体氯膦酸盐预处理相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或在经脂质体氯膦酸盐预处理的动物中用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的治疗结果。在该模型中,添加巨噬细胞杀伤剂脂质体氯膦酸盐基本上抑制了抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的肿瘤破坏。

[0033] 图6:NCI-H929骨髓瘤异种移植植物模型中肿瘤体积的图表,显示与单独的媒介物相比,以及与其中通过取代突变N297A除去了N297处的抗体Fc糖基化位点的非糖基化抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白治疗的结果。在该模型中,去除Fc糖基化显著减少了融合蛋白对肿瘤的破坏,表明肿瘤根除的机制可能包括抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的实质性贡献。

[0034] 图7:肿瘤体积图,显示单独使用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(以次优剂量)、单独非糖基化抗CD47抗体、两种药剂的组合或对照处理的结果。用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(次优剂量)与非糖基化抗CD47抗体的组合治疗在10只小鼠的10只中完全消除了NCI-H929肿瘤,而单独抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白在次优剂量下的活性仅适度延迟肿瘤生长并且不能治愈。

[0035] 图8:RPMI 8226多发性骨髓瘤异种移植植物模型中肿瘤体积的图,显示与媒介物或对照相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(以次优剂量)、使用非糖基化的抗CD47抗体进行CD47阻断、或抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(次优剂量)和非糖基化抗CD47抗体的组合进行治疗的结果。在该模型中,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体进行CD47阻断的组合在消融肿瘤(治愈10只动物中的8只)方面比用单独药物或对照药物组合治疗更有效。

[0036] 图9:OPM-2骨髓瘤异种移植模型中肿瘤体积的图,显示与媒介物或对照相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白、使用非糖基化的抗CD47抗体进行CD47阻断、或抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和非糖基化抗CD47抗体的组合进行治疗的结果。在该模型中,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b和通过非糖基化抗CD47抗体的CD47阻断的组合在消融肿瘤(10只动物中的5只被治愈)中比用单独药剂或对照药物组合治疗更有效。

[0037] 图10:A375黑素瘤异种移植模型中肿瘤体积的图,显示与媒介物相比,用抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白/使用非糖基化的抗CD47抗体的CD47阻断或者抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和非糖基化的抗CD47抗体的组合进行治疗的结果。在该模型中,抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和非糖基化的抗-CD47抗体的组合在延迟A375肿瘤的生长方面比用单独的药剂治疗更有效。

[0038] 图11:ARP-1难治性骨髓瘤异种移植模型中肿瘤体积的图,显示与载体或对照相比,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白、使用非糖基化抗CD47抗体进行CD47阻断或抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和非糖基化抗CD47抗体的组合进行治疗的结果。在该模型中,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和通过非糖基化抗CD47抗体的CD47阻断的组合在消融肿瘤(8只动物中的7只被治愈)中比用单独药物或对照药物的组合的治疗显著更有效。

[0039] 图12:来自图11中使用的来自抗CD47抗体的两种不同的非糖基化抗-CD47抗体克隆(2A1和5F9)提供的CD47阻断的ARP-1难治性骨髓瘤异种移植模型中肿瘤体积的图。该模型的结果显示,与其他治疗对肿瘤生长的中等或无影响相比,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与两种非糖基化抗CD47抗体克隆(2A1和5F9)中的任一种联合治疗可导致所有动物中的完全肿瘤消融(每组10只小鼠中有10只)。

[0040] 图13A:毛细胞(HC-1)白血病异种移植模型中的无肿瘤存活(TFS)图,显示用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白,用抗人HLA减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(通用靶抗体),或用无关抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白进行治疗的结果。在这种白血病模型中,与抗HLA-减弱的IFN $\alpha$

2b融合蛋白(100% TFS)相比,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(作为单一药剂)对存活率的影响最小(第33天为10% TFS)。

[0041] 图13B:毛细胞(HC-1)白血病异种移植模型中的无肿瘤存活(TFS)的图,显示与单独抗人HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(通用靶抗体)、抗CD20减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或与非糖基化抗CD47抗体组合或媒介物相比,用抗人CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体组合进行治疗的结果。该模型的结果显示,与之前的实验(图13A)中单独抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白相比,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与抗CD47抗体的组合显著提高了存活率(到第50天时40% TFS)。

[0042] 图14:CCRF-CEM T ALL异种移植模型中的无肿瘤存活(TFS)的图,显示与使用对照抗体或媒介物的治疗相比,单独使用抗CD52-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或与非糖基化抗CD47抗体的组合进行治疗的结果。该模型的结果表明,与单个药剂或对照抗体的组合相比,抗CD52-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体的组合导致存活增强和延长(第90天30% TFS)。

[0043] 图15:全身性B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)肿瘤MEC1 BCLL异种移植物模型中的无肿瘤存活(TFS)的图,显示与用对照抗体或媒介物处理相比,单独用抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或与非糖基化抗CD47抗体组合或单独抗CD19减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或与非糖基化抗CD47抗体组合进行治疗的结果。该模型的结果显示,单独使用抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白治疗可提高存活率(第90天50% TFS),而当抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化的抗CD47抗体组合使用时存活率大大提高(第90天时100% TFS)。与单独抗CD19减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白相比,当抗CD19减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化的抗CD47抗体组合时,存活率也适度增强。

[0044] 图16:NSCLC(H820)异种移植物模型中肿瘤体积的图表,其显示与单独抗-CD47或媒介物治疗相比,使用单独抗-EpCAM-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或与非糖基化抗-CD47抗体组合时进行治疗的结果。在该模型中,抗-EpCAM-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化的抗-CD47抗体的组合提供了超过单独人EpCAM-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或单独抗-CD47抗体的增强的肿瘤抑制。

[0045] 图17A:OPM2骨髓瘤异种移植物模型中肿瘤体积的图表,显示使用单独抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或与非糖基化抗CD47抗体一起,单独非糖基化抗CD47抗体或媒介物进行治疗的结果。黑色箭头表示治疗的时间点,灰色箭头表示肿瘤取样用于组织学分析的时间点。在该模型中,仅在用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体的组合治疗的动物中观察到增强的肿瘤抑制。

[0046] 图17B:取自图17A中所示实验的肿瘤样品的组织学分析的评分图表。与单独药剂或媒介物获得的弱CD45 $^+$ 细胞募集相比,在用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体的组合治疗的肿瘤中观察到CD45 $^+$ 细胞的强募集。每个条代表了单只小鼠。

[0047] 图18A:使用NOD SCID小鼠的H929骨髓瘤异种移植物模型中肿瘤体积的图,显示使用单独抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白或与非糖基化抗CD47抗体一起,单独非糖基化抗CD47抗体或媒介物进行治疗的结果。黑色箭头表示治疗的时间点,灰色箭头表示肿瘤取样用于组织学分析的时间点。在该模型中,通过抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和非糖基化抗CD47抗体的联合治疗观察到强烈的肿瘤抑制,而单独抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白提供

了小的抗肿瘤反应。

[0048] 图18B:取自图18A中所示实验的肿瘤样品的组织学分析的评分图。与单独药剂或媒介物获得的弱CD45<sup>+</sup>细胞募集相比,在用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体的组合治疗的肿瘤中观察到CD45<sup>+</sup>细胞的强募集。每个条代表单只小鼠。

## 具体实施方式

[0049] 在整个说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”或诸如“包含”或“包含”的变体将被理解为暗示包含所述要素或整数或者要素素或整数组。但不排除任何其他要素或整数或者要素或整数组。

[0050] 本说明书中对任何在先出版物(或从其衍生的信息)或任何已知事项的引用不是,也不应被视为承认、认可或以任何形式暗示在先出版物(或者来自它的信息)或已知事项构成本说明书所涉及的领域中的公知常识的一部分。

[0051] 本说明书中提及的所有出版物均通过引用整体并入本文。

[0052] 必须注意的是,如在本说明书中使用的,单数形式“一种(个)”和“该种(个)”包括复数方面,除非上下文另有明确说明。因此,例如,提及“一种药剂”包括单种药剂,以及两种或更多种药剂;提及“一个分子”包括单个分子,以及两个或多个分子;等等。

[0053] 在第一方面,本发明提供用于治疗受试者中肿瘤的组合疗法,该组合疗法包括施用(i)包含与肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原结合的抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN)并包含功能性Fc区的多肽构建体,和(ii)抑制CD47与SIRP $\alpha$ 受体相互作用的CD47拮抗剂。

[0054] 在本发明的组合疗法中,组分(i)和(ii)可以顺序或同时施用。

[0055] 在第二方面,本发明提供了治疗受试者中肿瘤的方法,包括使用本发明的组合疗法。

[0056] 在第三方面,本发明提供了一种组合物,其包含混合形式的本发明组合疗法的组分(i)和(ii)。

[0057] 在第四方面,本发明提供了本发明的组合疗法的组分(i)和(ii)在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。组分可以混合物形式给药或以任何顺序依次给药。本发明扩展到组分(i)在制备与组分(ii)一起用于治疗肿瘤的药物中的用途以及组分(ii)在制备与组分(i)一起用于治疗肿瘤的药物中的用途。

[0058] 如将清楚的是,本发明的一个特征是与肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原结合的抗体包含功能性Fc区。如本文所用,术语“功能性Fc区”是指该Fc区具有通过与巨噬细胞上的Fc $\gamma$ 受体相互作用而引发效应子功能的能力。特别地,功能性Fc能够通过抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)促进巨噬细胞的吞噬作用和/或通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)杀死细胞。补体固定也是Fc受体的功能。

[0059] 还将清楚的是,本发明的一个特征是I型干扰素是减弱的。如本文所用,术语“减弱的I型IFN”是指I型IFN的序列以相对于野生型I型干扰素降低了I型干扰素对具有IFN受体的细胞的效力的方式被改变(突变)。这种降低的效力可能是由于相对于野生型I型IFN,减弱的I型IFN对IFN受体的亲和力降低。I型IFN的效力可以通过EC50值定量表示,EC50值是剂量-响应曲线的数学中点,其中剂量是指测定中I型IFN抗体-I型IFN构建体的浓度,响应是

指细胞对特定剂量的IFN的信号传导活性的定量反应。对于I型IFN,可以使用基于细胞的干扰素应答元件(IRE)报道分子测定、胱天蛋白酶或细胞增殖应答来例如确定效力。

[0060] 在某些实施方案中,减弱的I型IFN通过肽键与抗体连接。该连接可以是直接的或通过长度为1至20个氨基酸的接头。通常,减弱的I型IFN将与抗体的轻链或重链恒定区的C末端连接。

[0061] 优选减弱的I型IFN是减弱的IFN $\alpha$ 。

[0062] 减弱的IFN $\alpha$ 可包含选自SEQ ID NOS 1至3、80至90、391和392的氨基酸序列。该序列还包括减弱IFN $\alpha$ 活性的至少一个氨基酸取代或缺失。

[0063] 在某些实施方案中,减弱的IFN $\alpha$ 是减弱的IFN $\alpha$ 2b。示例性的野生型IFN $\alpha$ 2b序列显示于SEQ ID NO:3中,并且在某些实施方案中,相对于野生型,减弱的IFN $\alpha$ 2b包含选自下述的至少一个氨基酸取代或缺失:L15A,R22A,R23A,S25A,L26A,F27A,L30A,L30V,K31A,D32A,R33A,R33K,R33Q,H34A,Q40A,D114R,L117A,R120A,R120E,R125A,R125E,K131A,E132A,K133A,K134A,M148A,R149A,S152A,L153A,N156A,(L30A,H57Y,E58N和Q61S),(R33A,H57Y,E58N和Q61S),(M148A,H57Y,E58N和Q61S),(L153A,H57Y,E58N和Q61S),(R144A,H57Y),E58N和Q61S),(N65A,L80A,Y85A和Y89A)(N65A,L80A,Y85A,Y89A和D114A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和L117A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和R120A),(Y85A,Y89A和D114A),(D114A和R120A),(L117A和R120A),(L117A,R120A和K121A),(R120A和K121A),(R120E和K121E),第144位的R被A、D、E、G、H、I、K、L、N、Q、S、T、V或Y取代,第145位的A被D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、V或Y取代,缺失残基L161至E165,及其组合。相对于野生型,优选的突变是A145D,这种减弱的IFN $\alpha$ 2b的一个实例显示在SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:536中。

[0064] 如本领域技术人员将认识到的,当使用不同的IFN $\alpha$ 2b序列时,上面提到的突变将在野生型IFN $\alpha$ 2b序列的相应位置进行。

[0065] 减弱的IFN $\alpha$ 2b也可以是非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b。非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b的残基T106可以缺失或被除T以外的氨基酸取代,以便在哺乳动物细胞中产生IFN $\alpha$ 2b时除去糖基化位点。

[0066] 在另一个实施方案中,细胞表面相关抗原选自下组:CD38,CD138,RANK配体,HM1.24,CD56,CS1,CD20,CD74,IL-6R,Blys(BAFF),BCMA,Kininogen, $\beta$ 2微球蛋白,FGFR3,ICAM-1,matriptase,CD52,EGFR,GM2, $\alpha$ 4整合素,IFG-1R,KIR,CD3,CD4,CD8,CD24,CD30,CD37,CD44,CD69,CD71,CD79,CD83,CD86,CD96,HLA,PD-1,ICOS,CD33,CD115,CD11c,CD19,CD52,CD14,FSP1,FAP,PDGFR $\alpha$ ,PDGFR $\beta$ ,ASGR1,ASGR2,FSP1,LyPD3,RTI140/Ti-alpha,HTI56,VEGF受体,CD241,RCHE基因的产物,CD117(c-kit),CD71(转铁蛋白受体),CD36(血小板反应蛋白受体),CD34,CD45R0,CD45RA,CD115,CD168,CD235,CD236,CD237,CD238,CD239,CD240 TROP2,CD70,CCR2,HER2,EGFR,IGF1R,CEA和CCR3。

[0067] 在一些实施方案中,细胞表面相关抗原包括CD38,CD138,EpCAM,TROP2,CD19,CD20,CD79b,CD22和CD52。

[0068] 在一个更具体的实施方案中,细胞表面相关抗原是CD38。在某些实施方案中,抗体的V<sub>H</sub>序列选自SEQ ID Nos:342、344、346、504和511,抗体的V<sub>L</sub>序列选自SEQ ID Nos:341、343、345、505、512和533;以及前述V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列的任何组合的相关抗体。作为参考抗体的“相关抗体”(包括“相关抗原结合片段”)的抗体包括以下抗体(及其抗原结合片段):与参照抗

体竞争结合靶抗原(例如,在一些实施方案中,对相同、重叠或相邻表位的竞争)具有参照抗体的表位特异性,包含参照抗体的互补决定区(CDR)(在一些实施方案中,在整个CDR中可能有多达1个、2个、3个、4个或5个保守氨基酸取代,或在每个CDR中有多达1或2个保守取代),或包含参照抗体的可变重链和可变轻链结构域(或与可变结构域可具有至少80、85、90、9、96、97、98、99%或更高氨基酸同一性,其中任何氨基酸变化均在框架区中并且可以是保守的或非保守的)。在一些实施方案中,保守取代由BLASTp的默认参数确定,而在其他实施方案中,保守突变是类别内取代,其中所述类别为脂肪族(甘氨酸,丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸),含羟基或硫/硒(丝氨酸,半胱氨酸,硒代半胱氨酸,苏氨酸,蛋氨酸),环状(脯氨酸),芳香族(苯丙氨酸,酪氨酸,色氨酸),碱性(组氨酸,赖氨酸,精氨酸),酸性和酰胺(天冬氨酸,谷氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺)。本领域技术人员认识到,通常多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代基本上不改变生物活性(参见例如Watson等人(1987)Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页(第4版))。此外,结构上或功能上相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物活性。

[0069] 在一个具体实施方案中, $V_H$ 序列是SEQ ID NO:504, $V_L$ 序列是SEQ ID NO:535。

[0070] 在某些特定实施方案中,多肽构建体的序列是SEQ ID NO:532和SEQ ID NO:533,或氨基酸序列与SEQ ID NO:532和SEQ ID NO:533至少80、85、90、95、96、97、98、99%或更多相同的氨基酸序列,优选包含上述突变。

[0071] 在某些实施方案中,CD47拮抗剂结合CD47并抑制其与SIRPa受体的相互作用。在这些实施方案中,CD47拮抗剂可以是抗CD47抗体,优选人抗体或人源化单克隆抗体。抗CD47抗体的实例包括W02017/053423,US2013/0224188中公开的那些和称为5F9(Wang等,2015,PLoS ONE 10(9):e0137345)、ZF1(Zeng等,Oncotarget,2016,第7卷,83040-8350)、INBRX-103(CC-90002)(Ce1基因)、Hu5f9-G4(Forty Seven Inc.)、NI-1701(Novimmune)、NI-1801(Novimmune)和SRF231(Surface Oncology)的抗体。

[0072] 在某些实施方案中,抗CD47抗体的序列提供于SEQ ID NO:509/510、513/514、515/516、517/518、519/520和509/534以及相关抗体。

[0073] CD47拮抗剂也可以是抗SIRPa抗体。这种抗SIRPa抗体也可以是人抗体或人源化单克隆抗体。这种抗体的一个实例是Effi-DEM(OSE Immunotherapeutics)。

[0074] 在另一种选择中,CD47拮抗剂可以是SIRPa的细胞外结构域。SIRPa的细胞外结构域可以附着于Fc。这种融合蛋白的一个例子是TTI-621(Petrova等,Clin Cancer Res,2016;DOI:10.1158/10780432.CCR-16-1700)。

[0075] 在Weiskopf,European Journal of Cancer,2017,76:100-109,Sockolosky等,PNAS,2016,10.1073,E2646-E2654和Sick等人,2012,167,1415-1430中提供了抑制CD47与SIRPa受体相互作用的已知拮抗剂的进一步讨论。这些参考文献的公开内容通过交叉引用包括在本文中。

[0076] 组合疗法的组分(i)和(ii)可以顺序或同时施用。如果顺序施用,则可以在组分(ii)之前施用组分(i),或者可以在组分(i)之前施用组分(ii)。

[0077] 在某些实施方案中,本发明的构建体是抗体-减弱的非糖基化IFNa2b融合构建体,其由于靶向感兴趣细胞上的细胞表面受体的抗体的作用和对细胞表面IFN受体具有降低的亲和力的减弱的IFNa2b二者而显示对于激活信号传导途径具有升高的抗原选择性指数。这

些构建体基于WO2013/059885中概述的发现，并且在WO2016/065409中更全面地公开。如这些文献中所解释的，在抗体-IFN融合构建体中，IFN部分以这样的方式突变：抗原阴性细胞上的IFN活性剧烈减弱，而抗原阳性细胞上的IFN活性仅适度地（如果有的话）减弱。与抗原阴性细胞相比，此类构建体对抗原阳性细胞显示出高一个、两个、三个、四个或五个数量级的最大效力。在一个实施方案中，抗体-减弱的IFN构建体保留非减弱的游离（即不附着于抗体）IFN对抗原阳性细胞的至少1%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%的效力。另外，在一个实施方案中，抗体-减弱的IFN构建体保留非减弱的游离（即未附着于抗体）IFN的最大活性的至少30%、至少50%、至少75%或至少90%；在这种情况下，“最大活性”应理解为意指在剂量-响应曲线的高平台部分的信号传导活性（或其下游效应）的量，其中药剂的进一步增加不会进一步增加响应）。

[0078] 如WO 2016/065409中所解释的，在本发明的构建体中使用减弱的非糖基化IFN $\alpha$ 2b获得了优势。因此，在某些实施方案中，这些减弱的细胞因子是优选的可以理解，I型干扰素的实例是IFN- $\alpha$  ( $\alpha$ )，其以各种形式存在(IFN- $\alpha$ 1、IFN- $\alpha$ 2、IFN- $\alpha$ 4、IFN- $\alpha$ 5、IFN- $\alpha$ 6、IFN- $\alpha$ 7、IFN- $\alpha$ 8、IFN- $\alpha$ 10、IFN- $\alpha$ 13、IFN- $\alpha$ 14、IFN- $\alpha$ 16、IFN- $\alpha$ 17和IFN- $\alpha$ 21, IFN- $\beta$  ( $\beta$ )，IFN- $\kappa$  ( $\kappa$ )，IFN- $\delta$  ( $\delta$ )，IFN- $\epsilon$  ( $\epsilon$ )，IFN- $\tau$  (tau)，IFN- $\omega$  ( $\omega$ ) 和IFN- $\zeta$  (zeta, 也称为limitin)。

[0079] 本发明还考虑了本发明的组合疗法与其他药物和/或除了其他治疗方案或方式之外，例如放射疗法或手术。当本发明的构建体与已知治疗剂组合使用时，所述组合可以依次给药（连续给药或通过不治疗的期间分开）或同时给药或作为混合物给药。在癌症的情况下，有许多已知的抗癌剂可用于本文。组合治疗还包括用本发明的构建体随后进行已知治疗，或用已知药剂治疗、然后用本发明的构建体治疗，例如作为维持治疗。例如，在癌症的治疗中，预期本发明的构建体可以与烷化剂（例如mechlorethamine, 环磷酰胺, 苯丁酸氮芥, 异环磷酰胺, 或含铂的烷基化剂如顺铂、卡铂和奥沙利铂），抗代谢物（如嘌呤或嘧啶类似物或抗叶酸剂，如硫唑嘌呤和巯基嘌呤），蒽环霉素（如柔红霉素, 阿霉素, 表柔比星伊白霉素, Valrubicin, 米托蒽醌或蒽环霉素类似物），植物生物碱（如长春花生物碱或紫杉烷, 如长春新碱, 长春碱, 长春瑞滨, 长春地辛, 紫杉醇或多西他赛），拓扑异构酶抑制剂（如I型或II型拓扑异构酶抑制剂），鬼臼毒素（如依托泊苷或替尼泊苷），或酪氨酸激酶抑制剂（如甲磺酸伊马替尼, 尼罗替尼或达沙替尼）组合施用。特别地，已知蒽环霉素在乳腺肿瘤细胞中引发干扰素应答，诱导CXCL5产生和巨噬细胞趋化性和活化。预期肿瘤定位施用IFN与CD47阻断相结合可增加这些药物的有效性。

[0080] 在治疗多发性骨髓瘤的情况下，预期本发明的组合可以与现有疗法组合施用，例如类固醇，例如地塞米松，蛋白酶体抑制剂（例如硼替佐米或卡非佐米），免疫调节药物（如沙利度胺, 来那度胺或泊马度胺），有或没有其他化学治疗剂，如盐酸美法仑或上面列出的化疗药物。

[0081] 在治疗霍奇金淋巴瘤的情况下，预期本发明的组合可以与目前的治疗方法组合施用，例如ABVD（阿霉素（阿霉素），博来霉素，长春碱和达卡巴嗪），或斯坦福V（多柔比星，博来霉素，长春碱，长春新碱，mechlorethamine，依托泊苷，泼尼松）或BEACOPP（多柔比星，博来霉素，长春新碱，环磷酰胺，丙卡巴肼，依托泊苷，泼尼松）。

[0082] 在非霍奇金淋巴瘤或其他淋巴瘤的情况下，预期本发明的组合可以与当前治疗方法组合施用。批准用于非霍奇金淋巴瘤的药物的实例包括Abitrexate（甲氨蝶呤），阿霉素

PFS(盐酸多柔比星),阿霉素RDF(盐酸阿霉素),Ambochlorin(苯丁酸氮芥),Amboclorin(苯丁酸氮芥),Arranon(Nelarabine),盐酸苯达莫司汀,Bexxar(Tositumomab)和Iodine I 131 Tositumomab),Blenoxane(博来霉素),博来霉素,Bortezomib,苯丁酸氮芥,Clafen(环磷酰胺),环磷酰胺,Cytoxan(环磷酰胺),Denileukin Diftitox,DepoCyt(脂质体阿糖胞苷),盐酸阿霉素,DTIC-Dome(达卡巴嗪),Folex(甲氨蝶呤),Folex PFS(甲氨蝶呤),Folotyn(Pralatrexate),Ibritumomab Tiuxetan,Istodax(Romidepsin),Leukeran(苯丁酸氮芥),Linfolizin(苯丁酸氮芥),脂质体阿糖胞苷,Matulane(盐酸丙卡巴肼),甲氨蝶呤,甲氨蝶呤LPF(甲氨蝶呤),Mexate(甲氨蝶呤),Mexate-AQ(甲氨蝶呤),Mozobil(Plerixafor),奈拉滨(Nelarabine),Neosar(环磷酰胺),Ontak(Denileukin Diftitox),普乐沙福(Plerixafor),Pralatrexate,Rituxan(利妥昔单抗),利妥昔单抗,罗米地新(Romidepsin),托西莫单抗(Tositumomab)和碘I 131托西莫单抗,Treanda(盐酸苯达莫司汀),Velban(长春碱硫酸盐),Velcade(Bortezomib)和Velsar(长春碱硫酸盐),长春碱硫酸盐,Vincasar PFS(长春新碱硫酸盐)),长春新碱硫酸盐,伏林司他(Vorinostat),泽娃灵(Zevalin)(替伊莫单抗Ibritumomab Tiuxetan),Zolinza(Vorinostat)。用于治疗非霍奇金淋巴瘤的药物组合的实例包括CHOP(C=环磷酰胺,H=盐酸多柔比星(羟基柔红霉素),O=硫酸长春新碱(Oncovin),P=泼尼松);COPP(C=环磷酰胺,O=硫酸长春新碱(Oncovin),P=盐酸丙卡巴肼,P=泼尼松);CVP(C=环磷酰胺,V=硫酸长春新碱,P=泼尼松);EPOCH(E=依托泊苷,P=泼尼松,O=硫酸长春新碱(Oncovin),C=环磷酰胺,H=盐酸多柔比星(羟基柔红霉素));ICE(I=异环磷酰胺,C=卡铂,E=依托泊苷)和R-CHOP(R=利妥昔单抗,C=环磷酰胺,H=盐酸多柔比星(羟基柔红霉素),O=硫酸长春新碱(Oncovin),P=泼尼松)。

[0083] 还考虑了类维生素A与本发明组合的组合。类维生素A是一类分子,它们在许多生物功能中起主要作用,包括生长、视觉、生殖、上皮细胞分化和免疫功能(Meyskens,F.等人,Crit Rev Oncol Hematol 3:75,1987,Herold,M.等人,Acta Dermatovener 74:29 1975)。单独或与其他药物联合使用视黄醇全反式维甲酸或ATRA的早期临床前研究显示出对急性早幼粒细胞白血病(APL)、骨髓增生异常综合征、慢性髓性白血病(CML),蕈样真菌病和多发性骨髓瘤的活性(综述在Smith,M.J.Clin.Oncol.10:839,1992中)。这些研究导致ATRA被批准用于治疗APL。目前有超过100项临床试验评估ATRA与其他疗法联合治疗血液系统恶性肿瘤、肾癌、肺癌、鳞状细胞癌等的活性。特别感兴趣并且与本发明直接相关的是证明当与ATRA组合时干扰素- $\alpha$ 治疗的功效增强的研究。这描述了套细胞淋巴瘤(Col,J.等人,Cancer Res.72:1825,2012),肾细胞癌(Aass,N.等人,J.Clin.Oncol.23:4172,2005;Motzer,R.J.Clin.Oncol.18:2972,2000),CML,黑素瘤,骨髓瘤和肾细胞癌(Kast,R.Cancer Biology and Therapy,7:1515,2008)和乳腺癌(Recchia,F.等人J.Interferon Cytokine Res.15:605,1995)。因此,本发明人预测,当在临幊上与ATRA的治疗剂量组合时,我们的靶向的减弱的IFN和CD47阻断的组合的活性增强。此外,Mehta(Mol Cancer Ther 3(3):345-52,2004)证明了用视黄酸体外处理白血病细胞诱导了CD38抗原的表达。因此,干扰素的增强功效加上靶CD38的诱导表达将表明ATRA与我们的抗CD38抗体-减弱的IFN $\alpha$ 联合治疗用于治疗表达CD38或可能由ATRA诱导表达CD38的IFN敏感性癌症中。此类癌症的实例是多发性骨髓瘤,非霍奇金淋巴瘤,CML和AML。

[0084] 基于直接刺激癌细胞上的I型IFN受体,I型IFN可具有抗癌活性。这已被证明可用

于多种类型的癌症,包括多发性骨髓瘤,黑素瘤,B细胞淋巴瘤,非小细胞肺癌,肾细胞癌,毛细胞白血病,慢性髓性白血病,卵巢癌,纤维肉瘤,宫颈癌,膀胱癌,星形细胞瘤,胰腺癌等(Borden,Cancer Research 42:4948-53,1982;Chawla-Sarkar,Clinical Cancer Research 7:1821-31,2001;Morgensen,Int J.Cancer 28:575-82,1981;Otsuka,British Journal of Hematology 103:518-529,1998;Lindner,J of Interferon and Cytokine Research 17:681-693,1997;Caraglia,Cell Death and Differentiation 6:773-80,1999;Ma,World J Gastroenterol 11(10):1521-8,2005)。本领域技术人员将认识到,本发明具有许多方面,其由CD47阻断与针对肿瘤相关抗原的抗体与减弱的I型干扰素融合的组合产生,并且所得融合蛋白构建体可用于减少表达相应肿瘤相关抗原的各种干扰素敏感性癌症的扩增。

[0085] 信号传导配体的许多其他实例也是本领域已知的,并且如上文非限制性示例性实施方案中所述,可以减弱并附着于与特定靶细胞上的抗原结合的抗体,从而允许配体在这些靶细胞上产生的生物信号的程度远大于在抗原阴性细胞上产生信号的程度。具有致瘤性巨噬细胞诱导或刺激活性的配体的实例包括TNF $\alpha$ ,Fas配体,IFN $\beta$ ,IFN $\gamma$ 或IFN $\lambda$ ,其可靶向各种肿瘤细胞表面抗原,如上文针对IFN $\alpha$ 所讨论的,并与CD47阻断组合。

[0086] 如本文所用,术语“抗体”广泛地指由四条多肽链,即两条重(H)链和两条轻(L)链组成任何免疫球蛋白(Ig)分子,或任何功能片段、突变体、变体或其衍生物,其保留Ig分子的基本表位结合特征。此类突变体、变体或衍生物抗体形式是本领域已知的,其非限制性实施方案在下文中讨论。

[0087] 在全长抗体中,每条重链由重链可变区(本文中缩写为HCVR或V<sub>H</sub>)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1,CH2和CH3组成。每条轻链由轻链可变区(本文中缩写为LCVR或V<sub>L</sub>)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成,其在人类中可以是 $\kappa$ 或 $\lambda$ 类。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。免疫球蛋白分子可以是任何类型(例如IgG,IgE,IgM,IgD,IgA和IgY),类别(例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgA1和IgA2)或亚类。

[0088] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合结构域”或“抗原结合部分”是指保留特异性结合抗原(例如CD38)的能力的抗体或蛋白质的一个或多个片段。已经显示抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。此类抗体实施方案还可以是双特异性,双重特异性或多特异性形式,特异地结合两种或更多种不同抗原。包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括(i)Fab片段,由VL,VH,CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')2片段,除铰链区的一部分外还包含两个Fab片段的二价片段,通过铰链区的二硫键连接;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v)结构域抗体(dAb)(Ward等人,1989Nature 341:544-6,Winter等人,PCT公开W090/05144A1,通过引用并入本文),其包括单个可变域;(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但它们可以通过重组方法通过合成接头连接,使得它们能够作为单个蛋白质链制备,其中VL区和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等,1988Science 242:423-6;Huston等,1988Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-83)。此类单链抗体也旨在包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。还包括其他

形式的单链抗体,例如双抗体。双抗体是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用的接头太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对和产生两个抗原结合位点(参见例如,Holliger,P.,et al.,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak,RJ,et al.,1994,Structure 2:1121-1123)。此类抗体结合部分是本领域已知的(Kontermann和Dube1编辑,Antibody Engineering 2001Springer-Verlag.New York.790pp.,ISBN3-540-41354-5)。在一个实施方案中,所述抗体结合部分是Fab片段。

[0089] 本文描述的抗体可以是人源化抗体。术语“人源化抗体”应理解为指包含人样可变区的蛋白质,其包括来自非人物种(例如,小鼠或大鼠或非人灵长类动物)的抗体的CDR,所述CDR被移植到或插入来自人抗体的FRs(这种类型的抗体也称为“CDR-移植抗体”)。人源化抗体还包括其中人蛋白质的一个或多个残基被一个或多个氨基酸取代修饰的蛋白质和/或人蛋白质的一个或多个FR残基被相应的非人残基取代。人源化抗体还可以包含既不在人抗体中也不在非人抗体中发现的残基。蛋白质的任何其他区域(例如,Fc区)通常是人的。可以使用本领域已知的方法进行人源化,例如US5,225,539,US6,054,297,US7,566,771或US5,585,089。术语“人源化抗体”还包括超人源化抗体,例如US7,732,578中所述。

[0090] 本文描述的抗体可以是人。如本文所用的术语“人抗体”是指具有在人中发现的可变和任选地恒定抗体区域的蛋白质,例如在人种系或体细胞中或使用这些区域产生的文库中发现的区域。“人”抗体可包括不由人序列编码的氨基酸残基,例如通过体外随机或定点突变引入的突变(特别是涉及蛋白质的少量残基中的保守取代或突变的突变,例如蛋白质的1,2,3,4或5个残基)。这些“人抗体”不一定需要是由于人的免疫应答而产生的,而是可以使用重组方法(例如,筛选噬菌体展示文库)和/或通过例如包含编码人抗体恒定区和/或可变区的核酸的转基因动物小鼠(例如小鼠)和/或使用引导选择产生的,例如,如US5,565,332中所述。该术语还包括这种抗体的亲和力成熟形式。出于本公开的目的,还将认为人蛋白质包括含有来自人抗体的FR或包含来自人FR的共有序列的序列的FR,并且其中一个或多个CDR是随机的或半随机的蛋白质,例如如US6,300,064和/或US6,248,516中所述。

[0091] 本发明多肽的抗体部分可以是任何类别的全长抗体,优选IgG1,IgG2或IgG4。这些抗体的恒定结构域优选是人。这些抗体的可变区可以是非人来源的,或者优选是人来源的或人源化的。也可以使用抗体片段代替全长抗体。

[0092] 术语“抗体”还包括工程化抗体。如将理解的,存在工程化抗体的许多变化形式(例如小鼠单克隆,嵌合,人源化和人单克隆抗体,单链可变抗体片段(scFv),微抗体,适体,以及如上所述的双特异性抗体和双抗体)。

[0093] 单可变区结构域(称为dAb)例如公开于(Ward等,1989,Nature 341:544-546;Hamers-Casterman等,1993,Nature 363:446-448;Davies&Riechmann,1994,FEBS Lett.339:285-290)。

[0094] 微抗体是完整抗体的小版本,其在单链中编码完整抗体的必需元件。合适地,微抗体由与免疫球蛋白分子的铰链区和CH3结构域融合的天然抗体的VH和VL结构域组成,例如如美国专利No.5,837,821中所公开的。

[0095] 在一个替代实施方案中,本发明提供的多肽构建体的抗体部分可包含非免疫球蛋白衍生的蛋白质框架。例如,可以参考(Ku&Schutz,1995,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:

6552-6556),其公开了具有两个环随机化以产生CDR的四螺旋束蛋白细胞色素b562,所述CDR已被选择用于抗原结合。本领域已知的另外的非免疫球蛋白支架包括小模块化免疫药物(参见例如美国专利申请公开号20080181892和20080227958),四连蛋白,纤连蛋白结构域,蛋白A,脂笼蛋白,锚蛋白重复序列和硫氧还蛋白。基于非免疫球蛋白支架的分子通常通过噬菌体展示,核糖体展示或本领域已知的其他技术通过体外选择文库以鉴定高亲和力结合序列来产生。

[0096] 使用本领域熟知的方法,可以通过例如亲和力成熟来增加结合,或通过去除预测的MHC II类结合基序来降低免疫原性。本文所述抗体的治疗效用可通过调节其功能特征来进一步增强,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),补体依赖性细胞毒性(CDC),抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),血清半衰期,生物分布和与Fc受体的结合或任何这些的组合。这种调节可以通过蛋白质工程,糖工程或化学方法实现。根据所需的治疗应用,增加或减少任何这些活性可能是有利的。

[0097] 糖工程的实例使用Shinkawa T.等人,2003(J Biol Chem 278:3466-73)中描述的**Potelligent®**方法。

[0098] 许多用于抗体亲和力成熟的方法是本领域已知的。其中许多基于通过诱变产生变体蛋白质组或文库、然后选择和/或筛选改善的亲和力的一般策略。诱变通常在DNA水平上进行,例如通过易错PCR(Thie, Voedisch等,2009,Methods Mol Biol 525:309-322),通过基因改组(Kolkman和Stemmer 2001,Nat Biotechnol. May;19(5):423-8),通过使用诱变化学品或辐射,使用具有容易出错的复制机制的“mutator”菌株(Greener 1996, In Vitro Mutagenesis Protocols.Humana press, NJ)或通过利用自然亲和力成熟机制的体细胞超突变方法(Peled,Kuang等人,2008,Annu Rev Immunol.26:481-511)。诱变也可以在RNA水平上进行,例如通过使用Qβ复制酶(Kopsidas,Roberts等,2006,Immunol Lett.2006年11月15日;107(2):163-8)。允许筛选改良的变体蛋白的基于文库的方法可以基于各种展示技术,例如噬菌体、酵母、核糖体、细菌或哺乳动物细胞,并且是本领域众所周知的(Benhar 2007,Expert Opin Biol Ther. May;7(5):763-79)。亲和力成熟可以通过更有针对性/预测性的方法实现,例如通过由3D蛋白质建模的发现引导的定点诱变或基因合成(参见例如Queen,Schneider等人1989,PNAS,86(24):10029-33,或美国专利6,180,370或美国专利5,225,539)。

[0099] Ferrara,Bunker等人,2006年,Biotechnol Bioeng;93:851-61;Li,Sethuraman等,2006年,Nat Biotechnol;24:210-5;Stavenhagen,Gorlatov等,2007年,Cancer Res.67:8882-90;Shields,Namenuk等,2001年,J Biol Chem;276:6591-604;Shinkawa,Nakamura等,2003年,J Biol Chem;278:3466-73;和WO 2008/006554已经描述了增加ADCC的方法。

[0100] 还可以在Fc区中进行突变,其增强与Fc γ RIIa的结合,增强肿瘤细胞的巨噬细胞吞噬作用。这些包括S239D,I332E和G236A。(Richards,J.等人,2008Mol.Canc.Ther.Vol.8,pp:2517)

[0101] Idusogie,Wong等人,2001年,J Immunol;176:346-56;Dall'Acqua,Cook等人,2006年,J Biol Chem;281:23514-24;Michaelsen,Aase等,1990年,Scand J Immunol;32:517-28;Brekke,Bremnes等,1993年,Mol Immunol;30:1419至1425年;Tan,Shopes等,1990

年,PNAS;87:162-6;和Norderhaug,Brekke等,1991年,Eur J Immunol;21:2379-84已经描述了增加CDC的方法。

[0102] 增加ADCP的方法已在Braster,O'Toole等人,2014年,Methods,65:28-37,Gul&Egmond,2015,Cancer Res;75:5008-5013中描述。

[0103] 描述增加ADCC和CDC的方法的参考文献包括Natsume,In等人,2008年,Cancer Res.68:3863-72。这些参考文献中的每一个的公开内容通过交叉引用包括在本文中。

[0104] 用于调节抗体血清半衰期和生物分布的许多方法基于修饰抗体与新生Fc受体(FcRn)之间的相互作用,所述新生Fc受体是在保护IgG免于分解代谢中起关键作用的受体,并且维持高血清抗体浓度。Dall'Acqua等人描述了IgG1 Fc区中的取代,所述取代增强了对FcRn的结合亲和力,从而增加了血清半衰期(Dall'Acqua,Woods等人,2002,J Immunol;169:5171-80),并且进一步证明了M252Y/S254T/T256E三重取代(根据EU索引的残基编号)或M265Y/S267T/T269(根据Kabat编号系统的残基编号)(Dall'Acqua,Kiener等人.2006,J Biol Chem;279:6213-6)增强生物利用度和调节ADCC活性。另见美国专利第6,277,375号;6,821,505;和7,083,784。Hinton等人已经描述了250和428位的恒定结构域氨基酸取代,其赋予体内半衰期增加(Hinton,Johlfors等人,2004,J Biol Chem;279:6213-6;Hinton,Xiong等人,2006,J Immunol;176:346-56)。另见美国专利7,217,797。Petkova等人已经描述了位置307,380和434处的恒定结构域氨基酸取代,其赋予体内半衰期增加(Petkova,Akilesh等人,2006,Int Immunol;18:1759-69)。也参见Shields等,2001,J Biol Chem;276:6591-604和WO 2000/42072。调节与Fc受体结合和由这些受体介导的后续功能(包括FcRn结合和血清半衰期)的恒定结构域氨基酸取代的其他实例。描述于美国专利申请号20090142340、20090068175和20090092599中。在Kabat中根据EU索引编号的本文中称为“S228P”的取代也根据Kabat等人(1987Sequences of proteins of immunological interest.United States Department of Health and Human Services,Washington DC.)被称为“S241P”。该取代稳定了IgG4分子的铰链区,具有使铰链区核心的序列与IgG1或IgG2同种型抗体的序列相同的作用。这导致重链的自发解离和重新缔合的减少,这经常导致异二聚体IgG4抗体的产生。

[0105] 已知与抗体分子连接的聚糖影响抗体与Fc受体和聚糖受体的相互作用,从而影响抗体活性,包括血清半衰期(Kaneko,Nimmerjahn等,2006,Science;313:670-3;Jones,Papac等人,2007,Glycobiology;17:529-40;和Kanda,Yamada等人,2007,Glycobiology;17:104-18)。因此,调节所需抗体活性的某些糖形式可赋予治疗优势。产生工程化糖型的方法是本领域已知的,包括但不限于美国专利号US6,602,684;US7,326,681;US7,388,081和WO2008/006554中所述的那些。

[0106] 通过添加聚乙二醇(PEG)延长半衰期已被广泛用于延长蛋白质的血清半衰期,例如Fishburn 2008,J Pharm Sci;97:4167-83中所综述的。

[0107] 如将认识到的,可以在本发明的序列内进行保守氨基酸取代。“保守取代”是指具有相似性质的氨基酸。如本说明书中所用,下列氨基酸组被视为保守取代:H,R和K;D,E,N和Q;V,I和L;C和M;S,T,P,A和G;以及F,Y和W。然而,并不意味着在减弱和/或糖基化位点处进行除了具体列举的那些之外的取代。

[0108] 如本文所用,术语“细胞表面相关抗原”广泛地指在细胞表面上表达的任何抗原,

包括但不限于恶性细胞或感染性或外来细胞。

[0109] 本发明的组合包含CD47拮抗剂。CD47拮抗剂抑制CD47与SIRPa的结合。已知有许多分子可拮抗CD47与SIRPa的结合。许多这些分子在以下参考文献中公开,其通过交叉引用包括在本文中:

[0110] US 7,282,556,US 8,101,719,US 8,562,997,US 8,758,750,US9,017,675,US 9,045,541,US 9,221,908,US 2012/0189625,US 2012/0282174,US 2014/0140989,US 2014/0161805,US 2014/0199308,US 2015/0274826,US2015/0329616,US2015/0353642,US2016/0008429,US2016/0009814和US2016/0009815,

[0111] 在一些实施方案中,优选CD47拮抗剂是抗体,优选单克隆抗体。在一些实施方案中,抗CD47抗体缺乏效应子功能。

[0112] 本领域已知有多种方法可去除效应子功能。一种是将残基N297上的N-连接糖基化位点替换为另一种残基,例如丙氨酸(如实施例中所示并命名为“非糖基化”)。其他方法包括在不使N297糖基化的细胞宿主中制备抗体(其包括N297)(例如在大肠杆菌中)。另一种方式是使用抗原结合抗体片段(Fab,Fab'2,scFv,Fv等),其中去除Fc的相关效应子功能部分。另一种方法是用糖苷酶如PNGase F除去残基N297上的糖基化。除去效应子功能的其他方法是包括一种或多种消除与各种Fc $\gamma$ 受体结合的已知Fc突变。

[0113] 在某些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:510或534的重链和SEQ ID NO:509的轻链。如上所述,在一些特定实施方案中,抗CD47抗体是非糖基化的。示例性的非糖基化抗体序列显示在SEQ ID NO:509和534中。

[0114] 在本发明的某些方面,本发明的组合或组合物被用于治疗患有癌症的患者。本文考虑的癌症包括:其特征在于不受控制的细胞生长(例如肿瘤的形成)、而这些细胞不会分化成专门的和不同的细胞的一组疾病和病症。此类疾病和病症包括ABL1原癌基因,AIDS相关癌症,听神经瘤,急性淋巴细胞白血病,急性髓性白血病,腺样囊性癌,肾上腺皮质癌,动脉粥样硬化性骨髓增生,脱发,肺泡软组织肉瘤,肛门癌,血管肉瘤,再生障碍性贫血,星形细胞瘤,共济失调-毛细血管扩张症,基底细胞癌(皮肤),膀胱癌,骨癌,肠癌,脑干胶质瘤,脑和中枢神经系统肿瘤,乳腺癌,类癌,宫颈癌,儿童脑肿瘤,儿童癌,儿童白血病,儿童期软组织肉瘤,软骨肉瘤,绒毛膜癌,慢性淋巴细胞白血病,慢性髓性白血病,结肠直肠癌,皮肤T细胞淋巴瘤,皮肤纤维肉瘤-突起,增生性小圆细胞肿瘤,导管癌,内分泌癌,子宫内膜癌,室管膜瘤,食道癌,尤文氏肉瘤,肝外胆管癌,眼癌,眼:黑色素瘤,视网膜母细胞瘤,食管癌管癌,范可尼贫血,纤维肉瘤,胆囊癌,胃癌,胃肠道癌,胃肠道类癌,泌尿生殖系统肿瘤,生殖细胞肿瘤,妊娠滋养细胞疾病,神经胶质瘤,妇科癌症,血液系统恶性肿瘤,毛细胞白血病,头颈癌,肝细胞癌,遗传性乳腺癌,组织细胞增多症,霍奇金病,人乳头瘤病毒,葡萄胎,高钙血症,下咽癌,眼内黑素瘤,胰岛细胞癌,卡波西氏肉瘤,肾癌,朗格汉氏细胞组织细胞增多症,喉癌,平滑肌肉瘤,白血病,Li-Fraumeni综合征,唇癌,脂肪肉瘤,肝癌,肺癌,淋巴水肿,淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金淋巴瘤,男性乳腺癌,肾脏恶性横纹肌瘤,成神经管细胞瘤,黑色素瘤,merkel细胞癌,间皮瘤,转移性癌,口腔癌,多发性内分泌肿瘤,蕈样真菌病,骨髓增生异常综合征,多发性骨髓瘤,骨髓增生性疾病,鼻癌,鼻咽癌,肾母细胞瘤,神经母细胞瘤,神经纤维瘤病,奈梅金断裂综合征,非黑色素瘤皮肤癌,非小细胞肺癌(NSCLC),眼部癌,食道癌,口腔癌,口咽癌,骨肉瘤,造口术卵巢癌,胰腺癌,鼻窦癌,甲状腺癌,腮腺

癌,阴茎癌,外周神经外胚层肿瘤,垂体癌,真性红细胞增多症,前列腺癌,罕见癌症和相关疾病,肾细胞癌,视网膜母细胞瘤,横纹肌肉瘤,Rothmund-Thomson综合征,唾液腺癌,肉瘤,神经鞘瘤,Sezary综合征,皮肤癌,小细胞肺癌(SCLC),小肠癌,软组织肉瘤,脊髓肿瘤,鳞状细胞癌-(皮肤),胃癌,滑膜肉瘤,睾丸癌,胸腺癌,甲状腺癌,移行细胞癌(膀胱),移行细胞癌(肾-骨盆-/-输尿管),滋养细胞癌,尿道癌,泌尿系统癌,uroplakins,子宫肉瘤,子宫癌,阴道癌,外阴癌,Waldenstrom's-巨球蛋白血症和Wilms肿瘤。在一个实施方案中,肿瘤选自多发性骨髓瘤或非霍奇金淋巴瘤。

[0115] 如所预期的用于治疗癌症,本发明组合的多肽构建体的抗体部分可以结合肿瘤相关抗原,即由癌细胞选择性表达或在癌细胞上相对于大多数正常细胞过表达的细胞表面抗原。本领域已知许多肿瘤相关抗原(TAA)。TAA的非限制性实例包括酪氨酸酶;黑色素瘤抗原GM2;甲胎蛋白(AFP);癌胚抗原(CEA);粘蛋白1(MUC1);人表皮生长因子受体(Her2/Neu);T细胞白血病/淋巴瘤1(TCL1)癌蛋白。与许多不同癌症相关的示例性TAA是端粒酶(hTERT);前列腺特异性膜抗原(PSMA);尿激酶型纤溶酶原激活物及其受体(uPA/uPAR);血管内皮生长因子及其受体(VEGF/VEGFR);细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN/CD147);表皮生长因子(EGFR);血小板衍生生长因子及其受体(PDGF/PDGFR)和c-kit(CD117)。

[0116] US2010/0297076中提供了其他TAA的列表,其公开内容通过引用包括在本文中。特别感兴趣的是与多发性骨髓瘤白血病或淋巴瘤细胞相关的细胞表面抗原,包括但不限于CD38,CD138,CD79,CS1和HM1.24。在一个实施方案中,抗原的配体-减弱的IFN构建体,例如抗体-减弱的干扰素构建体,是CD38。

[0117] CD38是46kDa的II型跨膜糖蛋白。它具有20个氨基酸的短N末端细胞质尾,单个跨膜螺旋和256个氨基酸的长细胞外结构域(Bergsagel,P.,Blood;85:436,1995和Liu,Q.,Structure,13:1331年,2005年)。它在许多免疫细胞的表面上表达,包括CD4和CD8阳性T细胞,B细胞,NK细胞,单核细胞,浆细胞,以及在显著比例的正常骨髓前体细胞上表达(Malavasi,F.,Hum.Immunol.9:9,1984)。然而,在淋巴细胞中,表达似乎依赖于细胞的分化和活化状态。静息的T细胞和B细胞是阴性的,而未成熟和活化的淋巴细胞主要是CD38表达阳性(Funaro,A.,J.Immunol.145:2390,1990)。另外的研究表明在非造血细胞器官如胰腺、脑、脾和肝中有mRNA表达(Koguma,T.,Biochim.Biophys.Acta 1223:160,1994。)

[0118] CD38是多功能的胞外酶,其参与跨膜信号传导和细胞粘附。它也被称为环状ADP核糖水解酶,因为它可以根据细胞外pH而将NAD<sup>+</sup>和NADP<sup>+</sup>转化为cADPR,ADPR和NAADP。这些产物在细胞内诱导Ca<sup>2+</sup>动员,这可导致酪氨酸磷酸化和细胞活化。CD38也是可以与配体CD31相互作用的受体。通过CD31激活受体可导致细胞内事件,包括Ca<sup>2+</sup>动员,细胞活化,增殖,分化和迁移(在Deaglio,S.,Trends in Mol.Med.14:210,2008中综述)。

[0119] CD38在多发性骨髓瘤细胞上,在大多数T-和B-谱系急性淋巴细胞白血病病例中,一些急性髓细胞性白血病,滤泡中心细胞淋巴瘤和T淋巴母细胞淋巴瘤中以高水平表达。(Malavasi,F.,J.Clin Lab Res.22:73,1992)。最近,CD38表达已成为B谱系慢性淋巴母细胞白血病(B-CLL)中可靠的预后标志物(Ibrahim,S.,Blood.98:181,2001和Durig,J.,Leuk.Res.25:927,2002)。独立小组已经证明,具有CD38+克隆的B-CLL患者的特征在于不利的临床过程,疾病进展更快,对化疗的反应性差且存活时间更短(Morabito,F.,Haematologica.87:217,2002)。CD38在淋巴类肿瘤上的一致和增强的表达使其成为治疗性

抗体技术的有吸引力的靶标。

[0120] 靶向CD38的抗体的实例提供于US7829672,US2009/0123950,US2009/304710,W02012/092612,W02014/178820和US2002/0164788中。这些参考文献的公开内容通过交叉引用包括在本文中。本发明延伸至这些参考文献中公开的抗CD38抗体的用途,其具有或不具有减弱的多肽信号传导配体,以及CD47拮抗剂,用于治疗受试者的肿瘤。特别感兴趣的是WO 2014/178820中公开的抗CD38抗体的范围。

[0121] 除CD38外的抗原是本领域公知的,这些抗原的非蛋白质实例包括鞘脂,神经节苷脂GD2 (Saleh等,1993,J. Immunol.,151,3390-3398),神经节苷脂GD3 (Shitara等,1993,Cancer Immunol. Immunother. 36:373-380),神经节苷脂GM2 (Livingston等,1994,J.Clin.Oncol.12:1036-1044),神经节苷脂GM3 (Hoon等,1993,Cancer Res.53:5244-5250) 和Lewis<sup>x</sup>,lewis<sup>y</sup>和lewis<sup>xy</sup>碳水化合物抗原,它们可以在蛋白质或糖脂上展示。蛋白质抗原的实例是HER-2/neu,人乳头瘤病毒-E6或-E7,MUC-1;KS1/4泛癌抗原 (Perez和Walker,1990,J. Immunol.142:3662-3667;Bumal,1988,Hybridoma 7 (4) :407-415);卵巢癌抗原CA125 (Yu等,1991,Cancer Res.51 (2) :468-475);前列腺酸磷酸盐 (Tailor等,1990,Nucl.Acids Res.18 (16) :4928);前列腺特异性抗原 (Henttu和Vihko,1989,Biochem.Biophys.Res.Comm.160 (2) :903-910;Israel等,1993,Cancer Res.53:227-230);黑素瘤相关抗原p97 (Estin等,1989,J.Natl.Cancer Inst.81 (6) :445-446);黑素瘤抗原gp75 (Vijayasardahl等,1990,J.Exp.Med.171 (4) :1375-1380);前列腺特异性膜抗原;癌胚抗原(CEA) (Foon等,1994,Proc.Am.Soc.Clin.Oncol.13:294),MUC16(抗体包括MJ-170,MJ-171,MJ-172和MJ-173[US 7,202,346],3A5[美国专利7,023,485],NMB(US 8,039,593),恶性人淋巴细胞抗原-AP0-1(Bernhard等,1989,Science 245:301-304);高分子量黑素瘤抗原(HMW-MAA) (Natali等,1987,Cancer 59:55-63;Mittelman等,1990,J.Clin.Invest.86:2136-2144);伯基特氏淋巴瘤抗原-38.13;CD19 (Ghetie等,1994,Blood 83:1329-1336);人B淋巴瘤抗原-CD20 (Reff等,1994,Blood 83:435-445);GICA 19-9 (Herlyn等,1982,J.Clin.Immunol.2:135),CTA-1和LEA;CD33 (Sgouros等,1993,J.Nucl.Med.34:422-430);用于肝癌或膀胱肿瘤癌胚抗原的癌胚抗原如甲胎蛋白 (Hellstrom等,1985,Cancer Res.45:2210-2188);分化抗原如人肺癌抗原L6或L20 (Hellstrom等,1986,Cancer Res.46:3917-3923);纤维肉瘤抗原;人白血病T细胞抗原-Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee等,1988,J.Immunol.141:1398-1403);肿瘤特异性移植型细胞表面抗原(TSTA),如病毒诱导的肿瘤抗原,包括T-抗原,DNA肿瘤病毒和RNA肿瘤病毒的包膜抗原;新糖蛋白,乳腺癌抗原如EGFR(表皮生长因子受体),多形性上皮粘蛋白(PEM) (Hilkens等,1992,Trends in Bio.Chem.Sci.17:359);多形性上皮粘蛋白抗原;人乳脂肪球抗原;结肠直肠肿瘤相关抗原如TAG-72 (Yokata等,1992,Cancer Res.52:3402-3408),CO 17-1A (Ragnhammar等,1993,Int.J.Cancer 53:751-758));分化抗原(Feizi,1985,Nature 314:53-57),如在胃腺癌中发现的I(Ma),在骨髓细胞中发现的SSEA-1,在乳腺上皮癌中发现的VEP8,VEP9,My1,VIM-D5,M18和M39,在结直肠癌中发现的D156-22,TRA-1-85(血型H),在结肠腺癌中发现的C14,在肺腺癌中发现的F3,在胃癌中发现的AH6,在胚胎癌细胞中发现的Y半抗原,在胰腺癌中发现的TL5(血型A),E1系列(血型B)抗原,在胚胎癌细胞中发现的FC10.2,胃腺癌抗原,在腺癌中发现的CO-514(血型Lea),在腺癌中发现的NS-10,CO-43(血型Leb),在A431细胞中发现的

G49,在结肠癌中发现的19.9;胃癌粘蛋白;在黑色素瘤中发现的R24;在结肠腺癌中发现的MH2(血型A1eb/Ley),在胚胎癌细胞中发现的4.2,D1.1,OFA-1,GM2,OFA-2和M1:22:25:8,和SSEA-3和SSEA-4。HMW-MAA(SEQ ID NO:390),也称为黑色素硫酸软骨素蛋白聚糖,是2322个残基的膜结合蛋白,其在超过90%的手术切除的良性痣和黑色素瘤病变中过表达(Camplo等,Crit Rev Immunol.24:267,2004)。因此,它可能是潜在的靶细胞表面相关抗原。

[0122] 用本发明组合的融合蛋白构建体靶向的其他示例性癌抗原包括(示例性癌症显示在括号中):CD5(T细胞白血病/淋巴瘤),CA15-3(癌),CA19-9(癌),L6(癌),CA 242(结肠直肠),胎盘碱性磷酸酶(癌),前列腺酸性磷酸酶(前列腺),MAGE-1(癌),MAGE-2(癌),MAGE-3(癌),MAGE-4(癌),转铁蛋白受体(癌),p97(黑色素瘤),MUC1(乳腺癌),MART1(黑色素瘤),CD20(非霍奇金淋巴瘤),CD52(白血病),CD33(白血病),人绒毛膜促性腺激素(癌),CD38(多发性骨髓瘤),CD21(B细胞淋巴瘤),CD22(淋巴瘤),CD25(B细胞淋巴瘤),CD37(B细胞淋巴瘤),CD45(急性髓细胞白血病),HLA-DR(B-细胞淋巴瘤),IL-2受体(T细胞白血病和淋巴瘤),CD40(淋巴瘤),CD79(B细胞白血病或淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤),各种粘蛋白(癌),P21(癌),MPG(黑色素瘤),Ep-CAM(上皮肿瘤),叶酸受体 $\alpha$ (卵巢),A33(结肠直肠),G250(肾),铁蛋白(霍奇金淋巴瘤),de2-7 EGFR(胶质母细胞瘤,乳腺和肺),成纤维细胞活化蛋白(上皮)和肌腱蛋白金属蛋白酶(胶质母细胞瘤)。一些特异的、有用的抗体包括但不限于BR64(Trail等,1997,Cancer Research 57:100105),BR96mAb(Trail等,1993,Science 261:212-215),针对CD40抗原的mAb,例如S2C6 mAb(Francisco等,2000,Cancer Res.60:3225-3231)或其他抗CD40抗体,例如美国专利公开号2003-0211100和2002-0142358中公开的那些;针对CD30抗原的mAb,例如AC10(Bowen等,1993,J. Immunol.151:5896-5906;Wahl等,2002Cancer Res.62(13):3736-42)或MDX-0060(美国专利公开号2004-0006215)和抗CD70抗原的mAb,例如1F6 mAb和2F2 mAb(参见例如美国专利公开号2006-0083736)或抗体2H5,10B4,8B5,18E7,69A7(US 8124738)。其他抗体已经在其他地方进行了综述(Franke等,2000,Cancer Biother. Radiopharm.15:459-76;Murray,2000,Semin.Oncol.27:64-70;Breitling,F.和Dubel,S.,Recombinant Antibodies,John Wiley, and Sons,New York,1998)。

[0123] 在某些实施方案中,有用的抗体可以结合靶细胞上表达的受体或受体复合物。受体或受体复合物可包含免疫球蛋白基因超家族成员,主要组织相容性蛋白,细胞因子受体,TNF受体超家族成员,趋化因子受体,整联蛋白,凝集素,补体控制蛋白,生长因子受体,激素受体或神经递质受体。合适的免疫球蛋白超家族成员的非限制性实例是CD2,CD3,CD4,CD8,CD19,CD22,CD79,CD90,CD152/CTLA-4,PD-1,B7-H4,B7-H3和ICOS。合适的TNF受体超家族成员的非限制性实例是TACI,BCMA,CD27,CD40,CD95/Fas,CD134/OX40,CD137/4-1BB,TNFR1,TNFR2,RANK,骨保护素,APO 3,Apo2/TRAIL R1,TRAIL R2,TRAIL R3和TRAIL R4。合适的整联蛋白的非限制性实例是CD11a,CD11b,CD11c,CD18,CD29,CD41,CD49a,CD49b,CD49c,CD49d,CD49e,CD49f,CD103和CD104。合适的凝集素的非限制性实例是S型,C型和I型凝集素.CEA抗体的实例如表1所示。

[0124] 表1

CEA 抗体				
[0125]	Ab 克隆	专利	受让人	评述
	<b>COL-1</b>	<b>US 6,417,337</b>	<b>The Dow Chemical Company</b>	人源化
	<b>806.077</b>	<b>US 6,903,203</b>	<b>AstraZeneca UK Ltd.</b>	人源化
[0126]	<b>T84.66</b>		<b>City of Hope</b>	人源化

[0127] 结合人B细胞上表达的CD22抗原的抗体包括例如HD6,RFB4,UV22-2,To15,4KB128和人源化抗CD22抗体(hLL2) (参见例如Li等人(1989)Cell.Immunol.111:85-99;Mason等(1987)Blood 69:836-40;Behr等(1999)Clin.Cancer Res.5:3304s-3314s;Bonardi等(1993)Cancer Res.53:3015-3021)。

[0128] CD33的抗体包括例如HuM195(参见例如Kossman等人(1999)Clin.Cancer Res.5:2748-2755;US5693761)和CMA-676(参见例如Sievers等人,(1999)Blood 93:3678-3684)。

[0129] 示例性抗MUC-1抗体包括但不限于Mc5(参见例如Peterson等人(1997)Cancer Res.57:1103-1108;Ozzello等人(1993)Breast Cancer Res.Treat.25:265-276)和hCTM01(参见例如Van Hof等人(1996)Cancer Res.56:5179-5185)。

[0130] 示例性抗TAG-72抗体包括但不限于CC49(参见例如Pavlinkova等人(1999)Clin.Cancer Res.5:2613-2619),B72.3(参见例如Divgi等人(1994)Nucl.Med.Biol.21:9-15),以及美国专利号5,976,531中公开的那些。

[0131] 示例性抗HM1.24抗体包括但不限于小鼠单克隆抗HM1.24和人源化抗HM1.24 IgG1kappa抗体(参见例如Ono等人(1999)Mol.Immuno 36:387-395)。

[0132] 在某些实施方案中,靶向部分包含抗Her2抗体。erBB 2基因,通常称为(Her-2/neu),是编码跨膜受体的致癌基因。已经针对Her-2/neu开发了几种抗体,其中一些已经临床使用。这些包括曲妥珠单抗(例如HERCEPTIN™;Fornir等人(1999)Oncology (Huntingt) 13:647-58),TAB-250(Rosenblum等人(1999)Clin.Cancer Res.5:865-874),BACH-250(同上),TA1(Maier等人(1991)Cancer Res.51:5361-5369),和美国专利5,772,997;5,770,195(mAb 4D5;ATCC CRL 10463);和美国专利号5,677,171中描述的mAb。

[0133] 其他完全人抗Her2/neu抗体是本领域技术人员熟知的。此类抗体包括但不限于C6抗体,例如C6.5,DPL5,G98A,C6MH3-B1,B1D2,C6VLB,C6VLD,C6VLE,C6VLF,C6MH3-D7,C6MH3-D6,C6MH3-D5,C6MH3-D3,C6MH3-D2,C6MH3-D1,C6MH3-C4,C6MH3-C3,C6MH3-B9,C6MH3-B5,C6MH3-B48,C6MH3-B47,C6MH3-B46,C6MH3-B43,C6MH3-B41,C6MH3-B39,C6MH3-B34,C6MH3-B33,C6MH3-B31,C6MH3-B27,C6MH3-B25,C6MH3-B21,C6MH3-B20,C6MH3-B2,C6MH3-B16,C6MH3-B15,C6MH3-B11,C6MH3-B1,C6MH3-A3,C6MH3-A2和C6ML3-9。这些和其他抗HER2/neu抗体描述于美国专利号6,512,097和5,977,322中,PCT公开WO 97/00271中,以及Schier等人(1996)J Mol Biol 255:28-43,Schier等(1996)J Mol Biol 263:551-567等中。

[0134] 更一般地,针对表皮生长因子受体家族的各种成员的抗体非常适合用作本发明构建体中的靶向抗体或其抗原结合部分。此类抗体包括但不限于如美国专利号5,844,093和5,558,864,以及欧洲专利号706,799A中所述的抗EGFR抗体。其他示例性抗EGFR家族抗体包

括但不限于抗体,例如C6.5,C6ML3-9,C6MH3-B1,C6-B1D2,F5,HER3.A5,HER3.F4,HER3.H1,HER3.H3,HER3.E12,HER3.B12,EGFR.E12,EGFR.C10,EGFR.B11,EGFR.E8,HER4.B4,HER4.G4,HER4.F4,HER4.A8,HER4.B6,HER4.D4,HER4.D7,HER4.D11,HER4.D12,HER4.E3,HER4.E7,HER4.F8和HER4.C7等(参见例如美国专利公开US2006/0099205 A1和US2004/0071696 A1,它们通过引用并入本文)。

[0135] CD38作为本发明的融合蛋白构建体的抗体靶特别受关注。CD38的抗体包括例如Daratumumab,AT13/5(参见例如Ellis等人(1995)J.Immunol.155:925-937),HB7,WO 2014/178820中公开的抗体(其公开内容通过引用包括在此)等。优选的抗CD38抗体的序列作为SEQ ID NOS 506和507提供。

[0136] 本发明还提供一种或多种包含本发明组合的组合物。这些组合物可进一步包含任何合适助剂中的至少一种,例如但不限于稀释剂,粘合剂,稳定剂,缓冲剂,盐,亲脂性溶剂,防腐剂,佐剂等。药学上可接受的助剂是优选的。制备这种无菌溶液的非限制性实例和方法是本领域熟知的,例如但不限于Gennaro编,Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.(Easton,Pa.)。可以常规选择适合于本领域公知的或如本文所述的抗体组合物的给药方式,溶解度和/或稳定性的药学上可接受的载体。

[0137] 可用于本发明组合物的药物赋形剂和添加剂包括但不限于蛋白质,肽,氨基酸,脂质和碳水化合物(例如,糖,包括单糖,二糖,三糖,四糖和寡糖;衍生化;糖,如醛醇,醛糖酸,酯化糖等;和多糖或糖聚合物),它们可以单独或组合存在,单独或组合包含1-99.99%重量或体积。示例性蛋白质赋形剂包括血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA),重组人白蛋白(rHA),明胶,酪蛋白等。也可以缓冲能力起作用的代表性氨基酸包括丙氨酸,甘氨酸,精氨酸,甜菜碱,组氨酸,谷氨酸,天冬氨酸,半胱氨酸,赖氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,缬氨酸,蛋氨酸,苯丙氨酸,阿斯巴甜,其组合如精氨酸-组氨酸缓冲液等。一种优选的氨基酸是组氨酸。另一种优选的氨基酸是精氨酸。

[0138] 适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括,例如,单糖,例如果糖,麦芽糖,半乳糖,葡萄糖,D-甘露糖,山梨糖等;二糖,如乳糖,蔗糖,海藻糖,纤维二糖等;多糖,如棉子糖,松三糖,麦芽糖糊精,葡聚糖,淀粉等;和醛糖醇,如甘露醇,木糖醇,麦芽糖醇,乳糖醇,木糖醇,山梨糖醇(葡萄糖醇),肌醇等。用于本发明的优选的碳水化合物赋形剂是甘露醇,海藻糖和棉子糖。

[0139] 抗体组合物还可包含缓冲剂或pH调节剂;通常,缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐,例如柠檬酸,抗坏血酸,葡糖酸,碳酸,酒石酸,琥珀酸,乙酸或邻苯二甲酸的盐;Tris,盐酸氨基三醇,磷酸盐缓冲液或氨基酸缓冲液。用于本发明组合物的优选缓冲剂是有机酸盐,例如柠檬酸盐或氨基酸。

[0140] 另外,本发明的组合物可包括聚合物赋形剂/添加剂,例如聚乙烯吡咯烷酮,聚乙二醇(聚糖),葡聚糖(例如环糊精,例如2-羟丙基-β-环糊精),聚乙二醇,调味剂,抗微生物剂,甜味剂,抗氧化剂,抗静电剂,表面活性剂(如聚山梨醇酯,如“**TWEEN®20**”和“**TWEEN®80**”),脂类(如磷脂,脂肪酸),类固醇(如胆固醇)和螯合剂(例如EDTA)。

[0141] 适用于本发明抗体组合物的这些和另外的已知药物赋形剂和/或添加剂是本领域已知的,例如,如“Remington:The Science&Practice of Pharmacy”,19ed。中所列,Williams&Williams,(1995),和“Physician's Desk Reference”,第52版,Medical

Economics, Montvale, NJ (1998), 其公开内容通过引用整体并入本文。优选的载体或赋形剂材料是碳水化合物(例如糖类和醇)和缓冲剂(例如柠檬酸盐)或聚合物试剂。

[0142] 本领域技术人员将理解,除了具体描述的那些之外,本文描述的发明易于进行变化和修改。应理解,本发明包括落入本发明精神和范围内的所有这些变化和修改。本发明还包括本说明书中单独或共同提及或指出的所有步骤,特征,组合物和化合物,以及任何两个或更多个所述步骤或特征的任何和所有组合。

[0143] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的任何材料和方法可用于实践或测试本发明,但现在描述优选的材料和方法。

[0144] 实施例

[0145] 实施例1

[0146] 在骨髓瘤异种移植模型中CD38减弱的IFN $\alpha$ 2b的稳健且持久的抗肿瘤活性

[0147] 将NCI-H929浆细胞骨髓瘤细胞在标准生长培养基和条件下以指数生长的悬浮培养物形式维持。在对数期生长期间收获用于植入的肿瘤细胞,并以 $1 \times 10^8$ 个细胞/mL的浓度重悬浮于50%Matrigel (BD Biosciences) 中。将 $1 \times 10^7$ 个肿瘤细胞(0.1mL细胞悬浮液)皮下植入8-9周龄雌性严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠的左侧腹中。在该模型中,CD38+骨髓瘤肿瘤细胞生长为血管化皮下肿块。在治疗开始前,允许肿瘤生长至平均体积 $150\text{mm}^3$ 。用二维卡尺测量肿瘤以监测尺寸。用5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(SEQ ID NOS 507/508)或由无关抗体与减弱IFN $\alpha$ 2b融合组成的同种型对照融合蛋白或媒介物以0.2mL的固定体积腹膜内处理小鼠(10只/组),每周两次,共4周。监测肿瘤体积。平均(+/-SEM)肿瘤体积如图1所示。结果表明抗CD38-减弱的干扰素 $\alpha$ 2b融合蛋白在该模型中具有强大的抗肿瘤活性,10只小鼠中有10只显示肿瘤消失,治疗停止后没有再次出现(“治愈”响应)。用与减弱的IFN $\alpha$ 2b融合的无关抗体或媒介物对照处理的动物均没有被治愈。

[0148] 实施例2

[0149] 巨噬细胞参与反应性骨髓瘤模型H929中抗CD38-减弱的干扰素 $\alpha$ 2b融合蛋白活性

[0150] 为了分析介导实施例1中说明的抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NOS 507/508)的强抗肿瘤活性的机制,切下来自治疗组与未治疗组或对照组小鼠的肿瘤并通过免疫组织化学评估。如实施例1所述使细胞生长,制备并植入小鼠。在治疗开始前使肿瘤生长至平均体积 $600\text{-}750\text{mm}^3$ 。在第1和4天用PBS,10mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(SEQ ID NOS:507/508)或由与减弱的IFN $\alpha$ 2b融合的无关抗体组成的同种型对照以腹膜内处理小鼠(12只/组群)(图2A中x轴上方的黑色箭头)。每天测量肿瘤大小,并在图2A中绘制平均(+/-SEM)肿瘤体积。在选定的时间点(灰色箭头),从每组的3只小鼠切下肿瘤,并冷冻用于下面详细描述的免疫组织化学评估。制作切除肿瘤的横切片(每组2个)并用苏木精染色以进行肿瘤大小比较。

[0151] 对切除的肿瘤切片进行免疫组织化学分析(图2B)。使用的标记是:对于小鼠白细胞为CD45(大鼠抗小鼠CD45,abcam#ab25386,5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),对于小鼠巨噬细胞为F4/80(大鼠抗小鼠F4/80,abcam#ab6640,10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),大鼠IgG2b同种型对照(大鼠IgG2b,abcam#ab18531,10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)(兔抗小鼠iNOS,novus#NBP1-33780,1:1,000)作为M1巨噬细胞标记物和兔IgG对照(invitrogen#086199)。在光学显微镜下检查染

色的载玻片，并进行CD45<sup>+</sup>,F4/80<sup>+</sup>和iNOS<sup>+</sup>浸润的定量。

[0152] CD45和F4/80染色在所有肿瘤中显示非常相似的模式，表明CD45<sup>+</sup>浸润细胞主要由小鼠巨噬细胞组成。来自三个治疗组的离体肿瘤的比较表明弥漫性巨噬细胞浸润到用抗CD38-减弱IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理的小鼠的肿瘤中但不进入对照处理的肿瘤中(现在显示数据)。在治疗开始后24小时观察到巨噬细胞浸润，并在该模型中在第5天达到峰值。

[0153] 视觉评估巨噬细胞浸润和侵袭程度，并基于多个标准评分，包括显示巨噬细胞浸润的肿瘤周长百分比，巨噬细胞从肿瘤表面渗入肿瘤的深度，以及肿瘤细胞团的降解或丢失，其被巨噬细胞浸润和基质取代。得分“0”表示在整个肿瘤块中均匀分散的CD45<sup>+</sup>(驻留巨噬细胞)浸润以及完整和确定的外周肿瘤边界和囊。得分“10”表明沿着肿瘤边缘的巨噬细胞浸润密度高，巨噬细胞深度穿透超过肿瘤周边达到超过肿瘤直径的10%，肿瘤细胞团的显着降低和高比例肿瘤团块( $\geq 50\%$ )被巨噬细胞和/或基质取代。抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理的小鼠中的肿瘤在第3,5和7天显示出比与媒介物或无关抗体与减弱的IFN $\alpha$ 2b融合对照小鼠显着更高的分数，如图2B所示，表明抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白介导的巨噬细胞侵袭，其与肿瘤的破坏有关。每个栏都是单只小鼠的代表。肿瘤切片的iNOS免疫组织化学表明，浸润性巨噬细胞主要是M1巨噬细胞亚型，已知其具有杀肿瘤活性。这表明巨噬细胞浸润参与用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白观察到的强大抗肿瘤功效。

[0154] 实施例3

[0155] 巨噬细胞参与非响应性肾细胞癌模型786-0中的抗人HLA-减弱的干扰素 $\alpha$ 2b融合蛋白活性

[0156] 研究了巨噬细胞浸润在非响应性异种移植肿瘤模型中的作用。该研究以与实施例1和实施例2中描述的多发性骨髓瘤异种移植模型类似的方式进行。将1000万个表达人HLA的786-0肾细胞癌细胞与基质胶一起植入SCID小鼠中并且肿瘤生长至平均体积为500mm<sup>3</sup>。在图3A中用黑色箭头指示的时间点用PBS或10mg/kg抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b(HB95-IgG4)融合蛋白(SEQ ID NO:521和522)处理小鼠。该融合蛋白中使用的抗HLA抗体是人特异性的，因此与人肿瘤细胞结合但不与任何鼠细胞结合。在灰色箭头指示的时间点切除每组三只小鼠的肿瘤。如上所述进行免疫组织化学分析和巨噬细胞浸润的定量。由于该模型使用非响应性异种移植肿瘤，用抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理这些人肿瘤的小鼠显示没有抗肿瘤反应并且没有增加的巨噬细胞浸润，分别如图3A和3B所示。缺乏抗肿瘤反应和缺乏巨噬细胞浸润与肿瘤暴露于靶向抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白后巨噬细胞浸润程度和抗肿瘤反应程度之间的关联是一致的。

[0157] 实施例4

[0158] 用巨噬细胞缺陷型小鼠品系进行的体内研究表明，对于持久的抗肿瘤反应需要巨噬细胞

[0159] 检查使用NCI-H929多发性骨髓瘤细胞系的其他模型，以进一步评估巨噬细胞活性在强大的抗肿瘤反应中的作用。在这些模型中，三种小鼠品系用作骨髓瘤肿瘤的宿主，每种品系具有不同的免疫系统缺陷(总结于表2中)。SCID品系虽然缺少适应性免疫系统的T细胞和B细胞成分，但仍然具有树突细胞、巨噬细胞、NK细胞和补体。NOD-SCID品系在树突细胞、巨噬细胞和NK细胞方面存在缺陷，并且缺少功能性补体系统。NSG细胞系在树突细胞和巨噬细胞方面有缺陷，并且缺少NK细胞和功能性补体。

[0160] 表2

[0161]

先天免疫细胞	小鼠品系:	SCID	NOD_SCID	NSG
树突细胞		存在	受损	受损
巨噬细胞		存在	受损	受损
NK细胞		存在	受损	缺少
补体		存在	缺少	缺少

[0162] 在该研究中,将 $10^7$ 个表达CD38的NCI-H929细胞皮下植入每只小鼠的左侧腹中。在治疗开始前,允许肿瘤生长至平均体积 $150\text{mm}^3$ 。用5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-IgG4)融合蛋白(SEQ ID NO:507/508)或媒介物,每周两次处理小鼠(10只/组),持续4周。每天监测肿瘤体积并绘制在图4中。在SCID小鼠中10只小鼠中有10只治愈(治疗停止后没有看到肿瘤再生),在NOD-SCID中10只小鼠中只有2只治愈,并且没有一只NSC小鼠治愈。

[0163] 虽然具有完整巨噬细胞的SCID小鼠在施用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白后表现出强烈的治愈反应,但是NOD-SCID和NSG具有缺陷的单核细胞/巨噬细胞并且表现出显著不太强烈的反应,支持了巨噬细胞和/或树突细胞有助于介导强大的治疗功效的解释。在具有缺陷巨噬细胞区室的小鼠品系中观察到的延迟但未完全的反应可能反映了人IFN $\alpha$ 对肿瘤细胞的直接抗增殖活性。这种效应延迟了肿瘤的生长,但很少导致完全的治愈反应。

[0164] 实施例5

[0165] 在体内消耗巨噬细胞

[0166] 为了进一步探索功能性巨噬细胞活性是否是对CD38抗体靶向的减弱的I型干扰素融合蛋白的持久反应所需,表达CD38的NCI-H929异种移植物模型在使用氯膦酸盐脂质体化学耗尽巨噬细胞的SCID小鼠中进行。

[0167] 游离氯膦酸盐不容易通过脂质体或完整细胞膜的磷脂双层,但负载有氯膦酸盐的脂质体被巨噬细胞吞噬。一旦使用脂质体作为载体将氯膦酸盐递送到吞噬性巨噬细胞中,脂质体的磷脂双层在溶酶体磷脂酶的影响下被破坏,并且药物被释放到其累积的细胞质中。在细胞内氯膦酸盐超过阈值浓度后,细胞被不可逆地损伤并通过细胞凋亡而死亡(J. Immunol. Meth. 193:93-99, 1996)。从死亡的巨噬细胞或裂解的脂质体释放的任何游离氯膦酸盐在循环中具有极短的半衰期,因为它通过肾脏系统迅速从循环中除去。

[0168] 如实施例1所述培养、制备和植入NCI-H929肿瘤细胞。在治疗开始前使肿瘤生长至平均体积 $150\text{mm}^3$ 。用5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10a2-IgG4)融合蛋白(SEQ ID NO:507和SEQ ID NO:508)或媒介物静脉内处理小鼠(10只/组),每周两次,持续4周,同时伴随或不伴随脂质体氯膦酸盐治疗。将氯膦酸盐脂质体(购自Encapsula Nano Sciences LLC, 5mg/mL悬浮液)悬浮,并在第-2, 0, 1, 3, 6, 10和17天(相对于开始施用抗-CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b而言)静脉内施用0.1mL。定期每周监测肿瘤体积两次,并且绘制平均(+/-SEM)肿瘤体积,如图5所示。

[0169] 没有脂质体氯膦酸盐治疗的所有小鼠在用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理后被治愈,而给予脂质体氯膦酸盐导致肿瘤继续生长,尽管以延迟的速率。与先前的发现一致,使用氯膦酸盐脂质体消耗巨噬细胞阻止了完全的肿瘤根除(在4/10只动物中),表明巨噬细胞是响应中的关键组分,其导致完全肿瘤消除。

[0170] 实施例6

[0171] 体内评估FcGamma受体(Fc γ R)结合的重要性:

[0172] 巨噬细胞能够通过多种抗体依赖性机制杀死肿瘤细胞,例如抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),或通过抗体非依赖性机制(Int.J.Cancer;46,682-686,1990)。为了确定用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理发生的基于巨噬细胞的肿瘤细胞杀伤是抗体依赖性还是非依赖性,我们利用具有N297A取代的经修饰的抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白,其除去了该融合蛋白的人IgG4 Fc区中的糖基化位点。去除该糖基化位点使得融合蛋白的免疫球蛋白部分不能结合效应细胞(例如巨噬细胞)上的Fc γ R,因此Fc不能介导ADCC或ADCP。

[0173] 在该研究中,如先前在实施例1中所述培养、制备和植入NCI-H929骨髓瘤细胞。当肿瘤达到150mm<sup>3</sup>时,开始治疗(每周两次,总共四周)。用PBS或5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-IgG4)融合蛋白(SEQ ID NOS:507/508)或5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-IgG4)融合蛋白(N297A)(SEQ ID NO:531和507)的非糖基化变体处理组。定期测量肿瘤大小,并将平均肿瘤体积绘制在图6中。结果表明抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的活性需要功能性Fc γ R相互作用,以获得稳健的治愈性抗肿瘤反应。这暗示了ADCP和/或ADCC在强有力的肿瘤清除作用机制中的作用。

[0174] 实施例7

[0175] 增强巨噬细胞活性

[0176] 已经描述了CD47:SIRP $\alpha$ 轴与ADCP介导的巨噬细胞的抗肿瘤活性有关。为了评估该轴在抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-IgG4)融合蛋白的抗肿瘤活性中的贡献,将一种市售的抗人CD47阻断抗体(B6H12.2 Bio X细胞,BE0019-1)如下所述在其他人(Liu, et al., 2015, Nature Medicine)报道的功效模型的治疗期间施用。在一些实例中使用糖基化的商业抗体(SEQ ID NOS 513/514),并且在其他实例中使用非糖基化的变体(SEQ ID NOS 515/516)。

[0177] 血液系统恶性肿瘤模型:NCI-H92骨髓瘤

[0178] 在类似于实施例1中描述的NCI-H929骨髓瘤异种移植模型中评估抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(在次优剂量下)与非糖基化的抗CD47抗体的组合疗法的有效性。将1000万H929在50%基质胶中皮下(sc)接种到8-9周龄雌性SCID小鼠的胁腹中。当肿瘤达到平均尺寸150mm<sup>3</sup>时开始治疗。用(a)载体(PBS)(b)2mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NO:507/508),(c)5mg/kg非糖基化(以消除效应子功能)抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体(SEQ ID NOS:515/516),(d)2mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白加5mg/kg非糖基化抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体,或(e)2mg/kg抗CD38(h10A2-hIgG4)抗体加5mg/kg非糖基化抗体-抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体腹膜内(ip)处理小鼠(每组n=10)。每周两次施用所有融合蛋白和抗CD38抗体,持续四周。每隔一天施用非糖基化的抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体,持续14天。监测肿瘤体积。平均(+/-SEM)肿瘤体积显示在图7中。在该研究中,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白构建体在次优剂量下表现出中度肿瘤抑制并且不是治愈性的,但当与CD47阻断组合时,其强大的抗肿瘤消退得以恢复并且是治愈性的(10/10动物治愈)。

[0179] 血液系统恶性肿瘤模型:RPMI-8226骨髓瘤

[0180] 将1千万个表达CD38的RPMI-8226细胞皮下植入SCID小鼠的胁腹中。当肿瘤达到

130-170mm<sup>3</sup>的平均尺寸时开始治疗。通过腹膜内。每周两次注射 (a) 媒介物, (b) 次优剂量 (3mg/kg) 的抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b (h10A2-IgG4) 融合蛋白 (SEQ ID NOS:507/508), 共四周, 或 (c) 隔天5mg/kg非糖基化抗CD47抗体 (B6H12, IgG1) (SEQ ID NO:515/516), 持续14天; 或 (d) 3mg/kg抗CD38抗体 (h10A2-IgG4) (SEQ ID NO:506/507) 和非糖基化抗CD47抗体的方案, 与单独药剂相同的给药方案分开地施用, 或 (e) 3mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和非糖基化抗CD47抗体, 与单独药剂相同的给药方案分开地给药。每周两次测量肿瘤体积 (+/- SEM), 并绘制平均肿瘤体积, 如图8所示。

[0181] 单独的抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白疗法和抗CD38抗体与非糖基化抗CD47的组合疗法在RPMI-8226骨髓瘤异种移植模型中对肿瘤生长发挥中度抑制;然而,这种药剂组合没有完全消除肿瘤。仅用非糖基化的抗CD47抗体治疗没有效果。抗-CD47抗体和抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b (h10A2-IgG4) 融合蛋白的组合诱导了强烈的协同反应,在研究结束时治愈了8/10小鼠。

[0182] 血液学恶性肿瘤模型:OPM2骨髓瘤

[0183] 多发性骨髓瘤的表达CD38的OPM2骨髓瘤细胞系模型通常对用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b (h10A2-IgG4) 融合蛋白的治疗仅有微弱反应。我们研究了用抗CD47抗体共同治疗是否会增强抗肿瘤活性。将1x10<sup>7</sup>个OPM-2细胞皮下植入SCID小鼠的侧腹。当肿瘤达到130-170mm<sup>3</sup>的平均尺寸时开始治疗。经腹膜内注射 (a) 媒介物或 (b) 5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白 (h10A2-IgG4) (SEQ ID NOS 507/508), 每周两次,持续4周,或 (c) 抗CD38抗体 (h10A2-IgG4) (SEQ ID NOS:506/507), 每周两次,持续四周;或 (d) 每隔一天5mg/kg非糖基化(以消除效应子功能贡献)抗CD47抗体 (SEQ ID NOS:515/516), 持续14天;或 (e) 抗CD38抗体和非糖基化抗CD47抗体的组合方案或 (f) 抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和非糖基化抗CD47抗体在针对单一药剂所述的剂量下的组合方案。每周两次监测平均肿瘤体积 (+/- SEM) 并如图9所示绘图。

[0184] 通过仅施用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白,或仅施用抗CD38抗体或仅施用抗CD47抗体,没有小鼠被治愈。抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和抗CD47的组合增强了抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的活性,治疗停止后用组合方案治疗的10只小鼠中有5只保持无肿瘤。

[0185] 实体瘤恶性肿瘤模型:A375黑色素瘤

[0186] 我们还评估了CD47:SIRP $\alpha$ 轴对黑素瘤实体瘤模型中抗体靶向的减弱IFN $\alpha$ 2b活性的贡献。使用HB95抗体在具有由A375人黑素瘤细胞系产生的肿瘤的无胸腺裸鼠中进行异种移植研究,所述HB95抗体结合人HLA,但不结合鼠HLA(Barnstable等,1978,Cell 14:9-20)。将与基质胶混合的一千万个A375细胞植入无胸腺裸鼠中。当肿瘤达到1000mm<sup>3</sup>时,切除肿瘤,破碎并将小片段重新植入新宿主中。在第三代中,将片段植入无胸腺裸鼠中。当肿瘤达到170-200mm<sup>3</sup>的平均体积时,开始治疗(第0天)。通过腹膜内注射治疗小鼠。通过施用 (a) 媒介物或 (b) 5mg/kg抗人HLA (HB95-IgG4) 抗体靶向的减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白 (SEQ ID NOS: 567/568), 每周两次,持续4周,或 (c) 抗-CD47抗体 (SEQ ID NOS 513/514), 每隔一天5mg/kg,持续14天,或 (d) 抗人HLA-抗体靶向的减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与抗体-CD47抗体的组合或 (e) 同种型对照无关抗体-减弱的干扰素 $\alpha$ 2b融合蛋白构建体和抗CD47抗体的组合治疗小鼠。每周两次监测肿瘤体积(平均值+/- SEM),并将平均肿瘤体积绘制成如图10所示。

[0187] 人HLA靶向抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白基于HB95抗体,其结合人、但不结合鼠HLA (Barnstable等,1978,Cell 14:9-20),因此作为这些研究的“普遍”替代目标。用抗HLA抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白单独处理或仅用抗CD47抗体处理,未观察到该异种移植模型中的活性。然而,当组合两种治疗时,观察到显著的肿瘤生长延迟。使用同种型对照无关抗体-减弱IFN $\alpha$ 2b融合蛋白未观察到肿瘤生长的抑制。

[0188] 血液系统恶性肿瘤模型:ARP-1骨髓瘤

[0189] 在难治性骨髓瘤模型中研究了抗CD38抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白构建体与非糖基化的抗CD47抗体的组合。将ARP-1浆细胞骨髓瘤细胞标准生长培养基和条件下以指数生长的悬浮培养物维持。在对数期生长期间收获用于植入的肿瘤细胞。在皮下接种在50%基质胶中的500万个ARP-1细胞。到SCID小鼠的肋部。当肿瘤达到平均尺寸150mm<sup>3</sup>时开始治疗。经腹膜内注射(a)载体,(b)单独5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NO:507/508),(c)单独5mg/kg非糖基化抗-CD47(B6H12-mIgG1)(SEQ ID NOS 515/516)抗体,(d)5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白加5mg/kg非糖基化的抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体(SEQ ID NOS 515/516),或(e)5mg/kg的抗CD38(h10A2-hIgG4)抗体(SEQ ID NOS:506/507)加上5mg/kg非糖基化抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体处理小鼠(每组n=8)。每周两次给予所有融合蛋白和CD38抗体,持续四周。每隔一天给予抗CD47抗体,持续14天。每周两次监测肿瘤体积,并绘制平均肿瘤体积(SEM),如图11所示。在该模型中,仅CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白和非糖基化抗CD47抗体(B6H12-mIgG1)的联合治疗能够消融肿瘤(7/8只动物治愈)。

[0190] 血液系统恶性肿瘤模型:ARP-1骨髓瘤(CD47的2个单克隆)

[0191] 在难治性骨髓瘤模型ARP-1中研究了抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与两种不同的抗CD47抗体(克隆2A1和克隆5F9)(分别为SEQ ID NOS:517/518和SEQ ID NOS 519/520)的组合。如上所述进行ARP-1难治性骨髓瘤异种移植模型。当肿瘤达到平均尺寸150mm<sup>3</sup>时开始治疗。经腹膜内注射(a)媒介物,(b)单独5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NO:507/508),(c)单独5mg/kg非糖基化抗CD47(2A1-mIgG1)(SEQ ID NOS:517/518)抗体,(d)单独5mg/kg非糖基化抗CD47(5F9-IgG-mIgG1)(SEQ ID NOS:519/520)抗体,(e)5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白加5mg/kg非糖基化抗CD47(2A1-mIgG1)抗体,或(f)5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白加5mg/kg非糖基化抗CD47(5F9-mIgG1)抗体处理小鼠(每组n=10)。每周两次施用所有抗CD38抗体融合蛋白,持续四周。每隔一天给予抗CD47抗体,持续14天。平均肿瘤体积每周监测两次,将平均肿瘤体积(+/-SEM)绘图,如图12所示。抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-hIgG4)融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体克隆2A1或5F9(mIgG1)中任一种的组合治疗在该模型中能够完全消解骨髓瘤异种移植物(10/10动物治愈)。

[0192] 血液系统恶性肿瘤模型:毛细胞白血病

[0193] 研究了抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白对人毛细胞白血病模型的影响。将HC-1毛细胞白血病细胞在标准生长培养基和条件下以指数生长的悬浮培养物形式维持。在对数生长期间收获肿瘤细胞,并以 $1\times10^7$ 个细胞/mL的浓度在盐水中重悬浮。静脉内注射盐水溶液中的一百万个HC-1细胞到每只SCID小鼠中。接种后5天开始治疗,每周监测存活两次(图13A)。通过腹膜内注射(a)载体,(b)单独5mg/kg抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b(HB95-hIgG4)融合蛋

白 (SEQ ID NOS:521/522) , (c) 单独5mg/kg抗CD38-减弱IFN $\alpha$ 2b (h10A2-hIgG4) 融合蛋白 (SEQ ID NO:507/508) , 或 (d) 单独5mg/kg同种型对照无关抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b (hIgG4) 融合蛋白处理小鼠 (每组n=10) 。所有融合蛋白每周施用两次,持续四周。在该白血病模型中,与阳性对照抗人HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b抗体融合蛋白(第33天100%TFS)相比,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白(作为单一药剂)对存活提供的影响最小(第33天10%无肿瘤存活(TFS))。值得注意的是,CD38在该细胞系上的表达水平显著低于HLA,这可以解释抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的适度活性。

[0194] 研究了HC-1毛细胞白血病模型对抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白构建体与非糖基化抗CD47抗体的联合治疗的影响。静脉内注射盐水溶液中的一百万个HC-1细胞到每只SCID小鼠中。在接种后5天开始治疗,并每周监测存活两次(图13B)。通过腹膜内注射(a)媒介物,(b)单独5mg/kg抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b (HB95-hIgG4)融合蛋白 (SEQ ID NOS:521/522) ,(c)5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b (h10A2-hIgG4)融合蛋白 (SEQ ID NOS:507/508) 和5mg/kg非糖基化抗CD47抗体(B6H12-mIgG1) (SEQ ID NOS:515/516)的组合,(d)5mg/kg同种型对照无关抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b (IgG4)融合蛋白和5mg/kg非糖基化抗CD47抗体(B6H12-mIgG1)或(e)单独5mg/kg抗CD20-减弱的IFN $\alpha$ 2b (抗CD20-hIgG4)融合蛋白 (SEQ ID NOS:525/526) ,或(f)5mg/kg抗CD20-减弱的IFN $\alpha$ 2b (抗CD20-hIgG4)融合蛋白 (SEQ ID NO:525/526)与非糖基化的抗CD47 (B6H12-mIgG4)的组合处理小鼠(每组n=10)。每周两次给予所有融合蛋白,持续四周。每隔一天给予抗CD47抗体,持续14天。

[0195] 在该模型中,当与图13A中呈现的结果(其中单独的抗人CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b (h10A2-hIgG4)融合蛋白仅提供10%TFS)相比时,使用抗人CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b (h10A2-hIgG4)融合蛋白和非糖基化抗CD47 (B6H12-mIgG1)抗体(40%TFS)的组合观察到动物的存活增强。使用抗CD20-减弱的IFN $\alpha$ 2b (抗CD20-hIgG4)融合蛋白和非糖基化CD47的组合也观察到动物的存活增强(20%TFS)。(图13B)。

[0196] 血液系统恶性肿瘤模型:CCRF CEM,T细胞急性淋巴母细胞白血病

[0197] 抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和抗CD47裸抗体的组合在基于细胞系CCRF CEM的T细胞急性淋巴母细胞白血病模型中导致增强的抗肿瘤反应。CCRF CEM,T细胞急性淋巴母细胞样白血病细胞在标准生长培养基和条件以指数生长的悬浮培养物下维持。在对数期生长期间收获用于植入的肿瘤细胞。静脉内接种500万个CCRF CEM细胞的盐水溶液到SCID老鼠中。接种后7天开始治疗,监测存活(图14)。通过腹膜内注射(a)媒介物,(b)单独5mg/kg抗CD52-减弱的IFN $\alpha$ 2b (抗CD52-hIgG4)融合蛋白 (SEQ ID NOS:523/524) ,(c)抗CD52-减弱的IFN $\alpha$ 2b (抗CD52-hIgG4)融合蛋白加5mg/kg非糖基化抗CD47 (B6H12-IgG1)抗体 (SEQ ID NOS:515/516) ,或(d)5mg/kg抗CD52 (抗CD52-hIgG1)抗体 (SEQ ID NOS:523/537) 和5mg/kg非糖基化抗CD47 (B6H12-mIgG1)抗体处理小鼠(每组n=10)。每周两次施用所有融合蛋白和抗CD52抗体,持续四周。每隔一天施用抗CD47抗体,持续14天。

[0198] 在该模型中,与单独的赋形剂或抗CD52-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白相比,抗CD47抗体与裸抗CD52抗体或抗CD52-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白组合显示出增强的存活。在研究结束时,抗-CD47抗体与抗-CD52-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白组合提供了与抗-CD47抗体结合抗-CD52抗体(无存活)相比增强的存活(30%TFS)。

[0199] 血液系统恶性肿瘤模型:MEC-1,慢性B细胞白血病

[0200] 在MEC-1慢性B细胞白血病细胞中测试融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体的组合治疗。将MEC-1慢性B细胞白血病细胞在标准生长培养基和条件下以指数生长的悬浮培养物形式维持。静脉内接种盐水溶液中的500万个MEC-1细胞到每只SCID小鼠中。接种后8天开始治疗并监测存活(图14)。通过腹膜内注射(a)媒介物,(b)单独5mg/kg抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b(HB95-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NOS:521/522),(c)5mg/kg抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b(HB95-hIgG4)融合蛋白加5mg/kg非糖基化抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体(SEQ ID NOS:515/516),(d)5mg/kg同种型对照无关抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b(hIgG4同种型)融合蛋白加5mg/kg非糖基化抗CD47(B6H12,mIgG1)抗体,(e)单独5mg/kg抗CD19-减弱的IFN $\alpha$ 2b(16C4-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NOS:527/528),或(f)5mg/kg抗CD19-减弱的IFN $\alpha$ 2b(16C4-hIgG4)融合蛋白与非糖基化抗CD47(B6H12,mIgG1)抗体处理小鼠(每组n=10)。每周两次给予所有融合蛋白和抗CD19抗体,持续四周。每隔一天给予非糖基化的抗CD47抗体,持续14天。

[0201] 在该模型中,抗CD47阻断和抗HLA-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的组合在促进动物存活方面是有效的(图15)。与单一药物相比,抗CD19抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白加5mg/kg非糖基化抗CD47抗体显示延迟的肿瘤生长,但与同种型对照无关抗体减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白质与抗人CD47抗体的组合所见的效果相似。

[0202] 实体瘤恶性肿瘤模型:H820非小细胞肺癌(NSCLC)

[0203] 在基于细胞系H820的非小细胞肺癌模型中测试用融合蛋白构建体与非糖基化抗CD47抗体的组合的治疗。在标准生长培养基和条件下将H820肺非小癌细胞维持为指数生长的悬浮培养物。将与基质胶混合的一千万个H820细胞植入无胸腺裸鼠中。当肿瘤达到1000mm<sup>3</sup>时,切除肿瘤,破碎并将小片段重新植入新宿主中。在第三代中,将片段植入无胸腺裸鼠中。当肿瘤达到150mm<sup>3</sup>的平均体积时,开始治疗(第0天)。通过腹膜内注射(a)载体,(b)单独5mg/kg抗-EpCAM-减弱的IFN $\alpha$ 2b(EpAb 2-6-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NOS:529/530),(c)5mg/kg抗-EpCAM-减弱的IFN $\alpha$ 2b(EpAb 2-6-hIgG4)融合蛋白(SEQ ID NOS:529/530)加5mg/kg抗-CD47(B6H12-mIgG1)(SEQ ID NOS 515/516)抗体,或(d)单独5mg/kg抗CD47(B6H12-mIgG1)抗体处理小鼠(每组n=10)。所有融合蛋白构建体每周施用两次,持续四周。每隔一天施用抗CD47抗体,持续14天。每周监测肿瘤体积两次,并对平均肿瘤体积(+/-SEM)绘图,如图16所示。

[0204] 抗-EpCAM-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与抗-CD47抗体的组合疗法提供了增强的H820肿瘤抑制,超过单独使用抗-EpCAM-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白的抑制。

[0205] 实施例8

[0206] 在弱反应模型OPM2中,巨噬细胞参与抗CD38-减弱的干扰素 $\alpha$ 2b融合蛋白活性

[0207] 研究了巨噬细胞浸润在OPM-2(一种弱反应性多发性骨髓瘤异种移植肿瘤模型)中的作用。该研究以与上文实施例2中所述的骨髓瘤异种移植模型类似的方式进行。如实施例1所述使细胞生长,制备并植入SCID小鼠。治疗开始前使肿瘤生长至平均体积600-750mm<sup>3</sup>。通过腹膜内途径用(a)PBS载体,(b)第1和4天单独5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-IgG4)融合蛋白(SEQ ID NOS:507/508)(图17A中x轴上方显示的粗灰色箭头),或(c)5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白加5mg/kg抗CD47抗体(B6H12-mIgG1)(SEQ ID NOS 513/514)在第1,3,5和7天(图17A中x轴上方显示的细灰色箭头)腹膜内处理小鼠(12只/组群)。每天测量肿瘤大小,并且在图17A中对平均(+/-SEM)肿瘤体积绘图。在选定的时间点(黑色

箭头),从每组的3只小鼠切下肿瘤并冷冻用于免疫组织化学评估,如下所述。制作切除肿瘤的横切片(每组2个)并用苏木精染色以进行肿瘤大小比较。

[0208] 在弱反应性异种移植肿瘤的模型中,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-IgG4)融合蛋白处理的具有这些人肿瘤的小鼠显示出小的抗肿瘤反应,没有增加巨噬细胞的浸润,如图18B所示。缺乏抗肿瘤反应和缺乏巨噬细胞浸润与肿瘤暴露于靶向抗体-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白后巨噬细胞浸润和抗肿瘤反应之间的关系一致。然而,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白和抗CD47抗体的双重治疗确实导致强的抗肿瘤活性,并相应地增加巨噬细胞的浸润(图17B)。这进一步支持巨噬细胞在肿瘤靶向抗体-减弱的IFN $\alpha$ 融合蛋白的肿瘤根除机制中的作用,并支持将CD47阻断与这些融合蛋白结合的效用。

[0209] 实施例9

[0210] NOD SCID异种移植模型中响应性骨髓瘤H929中巨噬细胞参与抗CD38-减弱的干扰素 $\alpha$ 2b融合蛋白活性

[0211] 使用NOD SCID小鼠进一步研究巨噬细胞浸润在NCI-H929(响应性MM异种移植肿瘤模型)中的作用。NOD SCID是一种小鼠品系,其特征在于具有有缺陷的巨噬细胞(SIRP $\alpha$ 轴)、树突细胞、NK细胞和无补体系统。

[0212] 如实施例1中所述,使NCI-H929细胞生长、制备并植入小鼠。除了使用NOD SCID而不是SCID小鼠之外,以与实施例2中描述的骨髓瘤异种移植模型类似的方式进行该研究。在治疗开始前允许肿瘤生长至平均体积600-750mm<sup>3</sup>。通过腹膜内途径用(a)PBS载体,(b)在第1天和第4天单独5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b(h10A2-IgG4)融合蛋白(SEQ ID NO:507/508)(图18A中x轴上方显示的粗灰色箭头)或(c)在第1,3,5和7天5mg/kg抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与5mg/kg抗CD47抗体(B6H12-)mIgG1)(SEQ ID NOS 515/516)组合(图18A中x轴上方显示的细灰色箭头)处理小鼠(每组n=12)。每天测量肿瘤大小,并在图18A中绘制平均(+/-SEM)肿瘤体积。在选定的时间点(黑色箭头),从每组的3只小鼠切下肿瘤,并冷冻用于下面详细描述的免疫组织化学评估。制作切除肿瘤的横切片(每组2个)并用苏木精染色以进行肿瘤大小比较。

[0213] 在该研究中,用抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理的小鼠显示出有限的抗肿瘤反应,并且相应地,没有增加巨噬细胞的浸润,如图18B所示。相比之下,抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白与非糖基化抗CD47抗体的联合治疗使抗肿瘤活性以及巨噬细胞浸润恢复到与在用单独的抗CD38-减弱的IFN $\alpha$ 2b融合蛋白处理的SCID小鼠(图18A)中观察到的水平相当的水平(图18B)。这进一步支持巨噬细胞在肿瘤靶向抗体-减弱的IFN $\alpha$ 融合蛋白的肿瘤根除机制中的作用,并支持将CD47阻断与这些融合蛋白结合的效用。

## 序列表

SEQ ID NO:	物种	基因	亚型	变体
1	人	IFN	α1b	天然
2	人	IFN	α2a	天然
3	人	IFN	α2b	天然
4	人	IFN	α2b	L15A
5	人	IFN	α2b	A19W
6	人	IFN	α2b	R22A
7	人	IFN	α2b	R23A
8	人	IFN	α2b	S25A
9	人	IFN	α2b	L26A
10	人	IFN	α2b	F27A
11	人	IFN	α2b	L30A
12	人	IFN	α2b	L30V
13	人	IFN	α2b	K31A
14	人	IFN	α2b	D32A
15	人	IFN	α2b	R33K
[0214]	16	人	IFN	α2b
	17	人	IFN	α2b
	18	人	IFN	α2b
	19	人	IFN	α2b
	20	人	IFN	α2b
	21	人	IFN	α2b
	22	人	IFN	α2b
	23	人	IFN	α2b
	24	人	IFN	α2b
	25	人	IFN	α2b
	26	人	IFN	α2b
	27	人	IFN	α2b
	28	人	IFN	α2b
	29	人	IFN	α2b
	30	人	IFN	α2b
	31	人	IFN	α2b
	32	人	IFN	α2b
	33	人	IFN	α2b

SEQ ID NO:	物种	基因	亚型	变体	
34	人	IFN	α2b	R144H	
35	人	IFN	α2b	R144I	
36	人	IFN	α2b	R144K	
37	人	IFN	α2b	R144L	
38	人	IFN	α2b	R144N	
39	人	IFN	α2b	R144Q	
40	人	IFN	α2b	R144S	
41	人	IFN	α2b	R144T	
42	人	IFN	α2b	R144V	
43	人	IFN	α2b	R144Y	
44	人	IFN	α2b	A145D	
45	人	IFN	α2b	A145E	
46	人	IFN	α2b	A145G	
47	人	IFN	α2b	A145H	
48	人	IFN	α2b	A145I	
49	人	IFN	α2b	A145K	
[0215]	50	人	IFN	α2b	A145L
	51	人	IFN	α2b	A145M
	52	人	IFN	α2b	A145N
	53	人	IFN	α2b	A145Q
	54	人	IFN	α2b	A145R
	55	人	IFN	α2b	A145S
	56	人	IFN	α2b	A145T
	57	人	IFN	α2b	A145V
	58	人	IFN	α2b	A145Y
	59	人	IFN	α2b	M148A
	60	人	IFN	α2b	R149A
	61	人	IFN	α2b	S152A
	62	人	IFN	α2b	L153A
	63	人	IFN	α2b	N156A
	64	人	IFN	α2b	L30A+YNS
	65	人	IFN	α2b	R33A+YNS
	66	人	IFN	α2b	M148A+YNS
	67	人	IFN	α2b	L153A+YNS

SEQ ID NO:	物种	基因	亚型	变体
68	人	IFN	$\alpha 2b$	R144A+YNS N65A,L80A,Y85A,Y89
69	人	IFN	$\alpha 2b$	A N65A,L80A,Y85A,Y89
70	人	IFN	$\alpha 2b$	A,D114A N65A,L80A,Y85A,Y89
71	人	IFN	$\alpha 2b$	A,L117A N65A,L80A,Y85A,Y89
72	人	IFN	$\alpha 2b$	A,R120A
73	人	IFN	$\alpha 2b$	Y85A,Y89A,R120A
74	人	IFN	$\alpha 2b$	D114A,R120A
75	人	IFN	$\alpha 2b$	L117A,R120A
76	人	IFN	$\alpha 2b$	L117A,R120A,K121A
77	人	IFN	$\alpha 2b$	R120A,K121A
78	人	IFN	$\alpha 2b$	R120E,K121E
79	人	IFN	$\alpha 2b$	$\Delta [L161-E165]$
[0216]	80	人	$\alpha 4b$	天然
	81	人	$\alpha 5$	天然
	82	人	$\alpha 6$	天然
	83	人	$\alpha 7$	天然
	84	人	$\alpha 8$	天然
	85	人	$\alpha 10$	天然
	86	人	$\alpha 1a/13$	天然
	87	人	$\alpha 14$	天然
	88	人	$\alpha 16$	天然
	89	人	$\alpha 17$	天然
	90	人	$\alpha 21$	天然
	91	人	$\beta 1(a)$	天然
	92	人	$\beta 1(a)$	R27A
	93	人	$\beta 1(a)$	R35T
	94	人	$\beta 1(a)$	E42K
	95	人	$\beta 1(a)$	D54N
	96	人	$\beta 1(a)$	M62I
	97	人	$\beta 1(a)$	G78S

SEQ ID NO:	物种	基因	亚型	变体
98	人	IFN	β1(a)	K123A
99	人	IFN	β1(a)	C141Y
100	人	IFN	β1(a)	A142T
101	人	IFN	β1(a)	E149K
102	人	IFN	β1(a)	R152H
103	人	IFN	β1(b)	C17S
[0217]	104	人	IFN	β1(b) C17S,R35A
	105	人	IFN	β1(b) C17S,R147A
	106	人	CD38	人 带标签, ECD
	107	食蟹猴	CD38	食蟹猴 带标签, ECD
				ECD, 用于遗传接种
	108	人	CD38	人 (DNA)
				ECD, 用于遗传接种
	109	人	CD38	人 (翻译的)
	110	人	CD38	人 天然

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
111	G005 IgG1 (抗-CD38)	LC aa	人
112		HC aa	人
113		LC DNA	人
114		HC DNA	人
111	G005-HC-L0- IFN α (R144A) IgG1	LC aa	人
115		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
116		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L6- IFN α (R144A) IgG1	LC aa	人
117		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
118		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN α (A145G) IgG1	LC aa	人
119		HC aa	合成的

[0219]

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
113		LC DNA	人
120		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
121		HC aa	合成的
113	G005-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145G) IgG1	LC DNA	人
122		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
123	G005-HC-L6- IFN $\alpha$ (R144A) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
124		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
125	G005-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145G) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
126		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
127	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
128		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
129	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144A) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
130		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
131	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144D) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
132		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
133	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144E) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
134		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144G) IgG4	LC aa	人

[0220]

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
135	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144H) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
136		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
137		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
138		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144I) IgG4	LC aa	人
139		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
140		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144K) IgG4	LC aa	人
141		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
142		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144L) IgG4	LC aa	人
143		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
144		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144N) IgG4	LC aa	人
145		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
146		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144Q) IgG4	LC aa	人
147		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
148		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144S) IgG4	LC aa	人
149		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
150		HC DNA	合成的

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144T) IgG4	LC aa	人
151		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
152		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144V) IgG4	LC aa	人
153		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
154		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144Y) IgG4	LC aa	人
155		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
156		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	人
157	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145E) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
158		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145G) IgG4	LC aa	人
159		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
160		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145H) IgG4	LC aa	人
161		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
162		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145I) IgG4	LC aa	人
163		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
164		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145L) IgG4	LC aa	人
165		HC aa	合成的
113		LC DNA	人

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
166		HC DNA	合成的
111	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145K) IgG4	LC aa	人
167		HC aa	合成的
113		LC DNA	人
168		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
169	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145L) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
170		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
171	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145N) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
172		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
173	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145Q) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
174		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
175	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145R) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
176		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
177	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145S) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
178		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
179	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145T) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
180		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
181	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145V) IgG4	HC aa	合成的

[0223]

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
113		LC DNA	人
182		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
183	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145Y) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
184		HC DNA	合成的
185		LC aa	合成的
112	G005-LC-L6- IFN $\alpha$ (A145G) IgG1	HC aa	人
186		LC DNA	合成的
114		HC DNA	人
187		LC aa	合成的
112	G005-LC-L0- IFN $\alpha$ (A145G) IgG1	HC aa	人
188		LC DNA	合成的
114		HC DNA	人
111		LC aa	人
189	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
190		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
191	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R35A) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
192		HC DNA	合成的
111		LC aa	人
193	G005-HC-L0- IFN $\alpha$ (R147A) IgG4	HC aa	合成的
113		LC DNA	人
194		HC DNA	合成的
195		LC aa	人
196	MORAB03080 IgG1	HC aa	人
197		LC DNA	人
198		HC DNA	人
199	hu38SB19 (SAR650984) IgG1	LC aa	合成的

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
200	X355/02 IgG1	HC aa	合成的
201		LC DNA	合成的
202		HC DNA	合成的
203		LC aa	人
204		HC aa	人
205		LC DNA	人
206		HC DNA	人
203	X355/02-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144A) IgG4	LC aa	人
207		HC aa	合成的
205		LC DNA	人
208		HC DNA	合成的
203	X355/02-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	人
209		HC aa	合成的
205		LC DNA	人
210		HC DNA	合成的
211	X355/07 IgG	LC aa	人
212		HC aa	人
213		LC DNA	人
214		HC DNA	人
211	X355/07-HC-L0-IFN $\alpha$ (R144A) IgG4	LC aa	人
215		HC aa	合成的
213		LC DNA	人
216		HC DNA	合成的
211	X355/07-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	人
217		HC aa	合成的
213		LC DNA	人
218		HC DNA	合成的
219	X910/12 IgG1	LC aa	人
220		HC aa	人
221		LC DNA	人
222		HC DNA	人

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
219	X910/12-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144A) IgG4	LC aa	人
223		HC aa	合成的
221		LC DNA	人
224		HC DNA	合成的
219	X910/12-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	人
225		HC aa	合成的
221		LC DNA	人
226		HC DNA	合成的
227	X913/15 IgG1	LC aa	人
228		HC aa	人
229		LC DNA	人
230		HC DNA	人
227	X913/15-HC-L0- IFN $\alpha$ (R144A) IgG4	LC aa	人
231		HC aa	合成的
229		LC DNA	人
232		HC DNA	合成的
227	X913/15-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	人
233		HC aa	合成的
229		LC DNA	人
234		HC DNA	合成的
235	R5D1 IgG1	LC aa	合成的
236		HC aa	合成的
237		LC DNA	合成的
238		HC DNA	合成的
235	R5D1-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	合成的
239		HC aa	合成的
237		LC DNA	合成的
240		HC DNA	合成的
241	R5E8 IgG1	LC aa	合成的
242		HC aa	合成的
243		LC DNA	合成的

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
244		HC DNA	合成的
241		LC aa	合成的
245	R5E8-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	HC aa	合成的
243		LC DNA	合成的
246		HC DNA	合成的
247		LC aa	合成的
248	R10A2 IgG1	HC aa	合成的
249		LC DNA	合成的
250		HC DNA	合成的
247	R10A2-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	合成的
251		HC aa	合成的
249		LC DNA	合成的
252		HC DNA	合成的
253		LC aa	合成的
254	利妥昔单抗	HC aa	合成的
255		LC DNA	合成的
256		HC DNA	合成的
253		LC aa	合成的
257	利妥昔单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ IgG1	HC aa	合成的
255		LC DNA	合成的
258		HC DNA	合成的
253		LC aa	合成的
259	利妥昔单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ (R144A) IgG1	HC aa	合成的
255		LC DNA	合成的
260		HC DNA	合成的
253		LC aa	合成的
261	利妥昔单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145G) IgG1	HC aa	合成的
255		LC DNA	合成的
262		HC DNA	合成的
253	利妥昔单抗 -HC-L6-IFN $\alpha$ (R33A+YNS)	LC aa	合成的
263	IgG1	HC aa	合成的

[0226]

[0227]

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
255		LC DNA	合成的
264		HC DNA	合成的
253		LC aa	合成的
265	利妥昔单抗-HC-L6-IFN $\alpha$ (R144A+YNS)	HC aa	合成的
255	IgG1	LC DNA	合成的
266		HC DNA	合成的
253		LC aa	合成的
393	利妥昔单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ (R144A) IgG1	HC aa	合成的
255		LC DNA	合成的
394		HC DNA	合成的
267		LC aa	合成的
268	帕利珠单抗	HC aa	合成的
269		LC DNA	合成的
270		HC DNA	合成的
267		LC aa	合成的
271	帕利珠单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ IgG1	HC aa	合成的
269		LC DNA	合成的
272		HC DNA	合成的
267		LC aa	合成的
273	帕利珠单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ Fab	HC aa	合成的
269		LC DNA	合成的
274		HC DNA	合成的
267		LC aa	合成的
275	帕利珠单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145D) Fab	HC aa	合成的
269		LC DNA	合成的
276		HC DNA	合成的
277		LC aa	合成的
278	J110 IgG1	HC aa	合成的
279		LC DNA	合成的
280		HC DNA	合成的
281	HB95 IgG1	LC aa	合成的

[0228]

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
282	HB95-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	HC aa	合成的
283		LC DNA	合成的
284		HC DNA	合成的
281		LC aa	合成的
285		HC aa	合成的
283		LC DNA	合成的
286		HC DNA	合成的
281	HB95-HC-L6- IFN $\alpha$ Fab	LC aa	合成的
287		HC aa	合成的
283		LC DNA	合成的
288		HC DNA	合成的
281	HB95-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145D) Fab	LC aa	合成的
289		HC aa	合成的
283		LC DNA	合成的
290		HC DNA	合成的
281	HB95-HC-L16-IL-6 IgG1	LC aa	合成的
291		HC aa	合成的
283		LC DNA	合成的
292		HC DNA	合成的
281	HB95-HC-L16-IL-6(R179E) IgG1	LC aa	合成的
293		HC aa	合成的
283		LC DNA	合成的
294		HC DNA	合成的
295	nBT062 IgG1	LC aa	合成的
296		HC aa	合成的
297		LC DNA	合成的
298		HC DNA	合成的
295	nBT062-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	合成的
299		HC aa	合成的
297		LC DNA	合成的
300		HC DNA	合成的

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
301	C21 IgG1	LC aa	合成的
302		HC aa	合成的
303		LC DNA	合成的
304		HC DNA	合成的
301	C21-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	合成的
305		HC aa	合成的
303		LC DNA	合成的
306		HC DNA	合成的
307	7.1 IgG1	LC aa	合成的
308		HC aa	合成的
309		LC DNA	合成的
310		HC DNA	合成的
307	7.1-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	合成的
311		HC aa	合成的
309		LC DNA	合成的
312		HC DNA	合成的
313	2D12 IgG1	LC aa	合成的
314		HC aa	合成的
315		LC DNA	合成的
316		HC DNA	合成的
313	2D12-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145G) IgG1	LC aa	合成的
317		HC aa	合成的
315		LC DNA	合成的
318		HC DNA	合成的
313	2D12-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145G) IgG4	LC aa	合成的
319		HC aa	合成的
315		LC DNA	合成的
320		HC DNA	合成的
313	2D12-HC-L0- IFN $\alpha$ (A145D) IgG4	LC aa	合成的
321		HC aa	合成的
315		LC DNA	合成的

SEQ ID NO:	蛋白质名称	链	物种
322		HC DNA	合成的
313		LC aa	合成的
323		HC aa	合成的
315	2D12-HC-L6- IFN $\alpha$ Fab	LC DNA	合成的
324		HC DNA	合成的
313		LC aa	合成的
325	2D12-HC-L6- IFN $\alpha$ (A145D) Fab	HC aa	合成的
315		LC DNA	合成的
326		HC DNA	合成的
327	X355/01 IgG1	LC aa	人
328		HC aa	人
329		LC DNA	人
330		HC DNA	人
331	X355/04 IgG1	LC aa	人
332		HC aa	人
333		LC DNA	人
334		HC DNA	人
335	R10B10 IgG1	LC aa	合成的
336		HC aa	合成的
337	R7H11 IgG1	LC aa	合成的
338		HC aa	合成的
339	R7F11 IgG1	LC aa	合成的
340		HC aa	合成的
253	利妥昔单抗-HC-L6- IFN $\alpha$ (R33A) IgG1	LC aa	合成的
393		HC aa	合成的
255		LC DNA	合成的
394		HC DNA	合成的

SEQ NO:	ID	克隆	抗原	链	物种
[0231] 341	G005		CD38	V $\kappa$	人

SEQ	ID			
NO:	克隆	抗原	链	物种
342	G005	CD38	VH	人
343	MORAB03080	CD38	V $\lambda$	人
344	MORAB03080	CD38	VH	人
	hu38SB19			
345	(SAR650984)	CD38	V $\kappa$	合成的
	hu38SB19	CD38		
346	(SAR650984)		VH	合成的
347	X355/02	CD38	V $\lambda$	人
348	X355/02	CD38	VH	人
349	X355/07	CD38	V $\kappa$	人
350	X355/07	CD38	VH	人
351	X910/12	CD38	V $\lambda$	人
352	X910/12	CD38	VH	人
353	X913/15	CD38	V $\lambda$	人
354	X913/15	CD38	VH	人
[0232]	355	R5D1	V $\kappa$	大鼠
	356	R5D1	VH	大鼠
	357	R5E8	V $\kappa$	大鼠
	358	R5E8	VH	大鼠
	359	R10A2	V $\kappa$	大鼠
	360	R10A2	VH	大鼠
	361	利妥昔单抗	V $\kappa$	小鼠
	362	利妥昔单抗	VH	小鼠
		帕利珠单抗	呼吸道合胞病毒	
	363		(RSV)	V $\kappa$
	364	帕利珠单抗	VH	合成的
	365	J110	V $\kappa$	小鼠
	366	J110	VH	小鼠
	367	HB95	V $\kappa$	小鼠
	368	HB95	VH	小鼠
	369	nBT062	V $\kappa$	小鼠
	370	nBT062	VH	小鼠
	371	C21	高分子量黑色素瘤	V $\lambda$
				合成的

SEQ NO:	ID 克隆	抗原 相 关 抗 原 (HMW-MAA)	链	物种	
372	C21	HMW-MAA	VH	合成的	
373	7.1	HMW-MAA	Vκ	小鼠	
374	7.1	HMW-MAA	VH	小鼠	
375	2D12	黄热病毒 (YFV)	Vκ	小鼠	
376	2D12	YFV	VH	小鼠	
377	X355/01	CD38	Vκ	人	
378	X355/01	CD38	VH	人	
379	X355/04	CD38	Vκ	人	
380	X355/04	CD38	VH	人	
[0233]	381	CD38	Vλ	大鼠	
	382	CD38	VH	大鼠	
	383	CD38	Vλ	大鼠	
	384	CD38	VH	大鼠	
	385	CD38	Vκ	大鼠	
	386	CD38	VH	大鼠	
SEQ ID NO:	物种	基因			
387	人	CD20			
388	人	PD-1			
389	人	CD138			
390	人	高分子量黑色素瘤相关抗原 (HMW-MAA)			
391	人	IFN α 2c			
392	人	IFN α 4a			
SEQ ID NO:	分子				
395	在氨基酸 106 位具有突变的人干扰素 a2b				
396	在氨基酸 106 位具有缺失的人干扰素 a2b				
[0234]	397	包含减弱突变 L15A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 α -2-b			
	398	包含减弱突变 A19W 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 α-2-b			
	399	包含减弱突变 R22A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 α-2-b			
	400	包含减弱突变 R23A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 α-2-b			

SEQ ID NO:	分子
401	包含减弱突变 S25A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
402	包含减弱突变 L26A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
403	包含减弱突变 F27A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
404	包含减弱突变 L30X 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 A, V 的任何氨基酸
405	包含减弱突变 K31A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
406	包含减弱突变 D32A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
407	包含减弱突变 R33X 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 K, A, Q 的任何氨基酸
408	包含减弱突变 H34A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
409	包含减弱突变 Q40A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
410	包含减弱突变 D114R 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
411	包含减弱突变 L117A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
412	包含减弱突变 R120X 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 A, E 的任何氨基酸
[0235]	
413	包含减弱突变 R125X 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 A, E 的任何氨基酸
414	包含减弱突变 K131A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
415	包含减弱突变 E132A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
416	包含减弱突变 K133A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
417	包含减弱突变 K134A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
418	包含减弱突变 R144X 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V, Y 的任何氨基酸
419	包含减弱突变 A145X 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y 的任何氨基酸
420	包含减弱突变 M148A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
421	包含减弱突变 R149A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
422	包含减弱突变 S152A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
423	包含减弱突变 L153A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
424	包含减弱突变 N156A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
425	A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A592D, T553X), 其中 X 可以是选自 A, G, E, S, V 的任何氨基酸

SEQ ID NO:	分子
426	包含减弱突变 L30A, H57Y, E58N 和 Q61S 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
427	包含减弱突变 R33A, H57Y, E58N 和 Q61S 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
428	包含减弱突变 M148A, H57Y, E58N 和 Q61S 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
429	包含减弱突变 L153A, H57Y, E58N 和 Q61S 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
430	包含减弱突变 R144A, H57Y, E58N 和 Q61S 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
431	包含减弱突变 N65A,L80A, Y85A, Y89A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
432	包含减弱突变 N65A,L80A, Y85A, Y89A 和 D114A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
433	包含减弱突变 N65A,L80A, Y85A, Y89A 和 L117A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
434	包含减弱突变 N65A,L80A, Y85A, Y89A 和 R120A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
435	包含减弱突变 Y85A, Y89A 和 R120A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
436	包含减弱突变 D114A,R120A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
437	包含减弱突变 L117A,R120A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
438	包含减弱突变 L117A,R120A,K121A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
439	包含减弱突变 R120A,K121A 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
440	包含减弱突变 R120E,K121E 的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
441	包含残基 L161-E165 的减弱的缺失的非糖基化 (T106A) 人干扰素 $\alpha$ -2-b
442	掺入铰链稳定化取代 S228P 的构造成 IgG4 的 10.21 (抗-CD38) 的 VH 序列
443	掺入铰链稳定化取代 S228P 以及分别在第 252, 254, 256 位的YTE 残基、构造成 IgG4 的 10.21 的 VH 序列
444	构造成 IgG1 的 10.21 的 VH 序列

[0236]

SEQ ID NO:	分子
445	掺入取代 L238A 和 G240A 以降低效应子功能、构造成 IgG1 的 10.21 的 VH 序列
446	掺入取代 L235A 和 G237A (降低效应子功能)以及 M255Y, S257T, T259E、构造成 IgG1 的 10.21 的 VH 序列
447	构造到 IgG2 骨架上的 10.21 的 VH 序列
448	构造到 IgG2 骨架上、掺入取代 M251Y, S253T 和 T255E 的 10.21 的 VH 序列
449	构造到 IgG4 骨架上、掺入铰链稳定化取代 S228P 的 10.43 的 VH 序列
450	构造到 IgG4 骨架上、掺入铰链稳定化取代 S228P 的 10.152 的 VH 序列 P
451	构造到 IgG4 (S228P) 的 X2.12 VH 序列
452	构造到 IgG4 (S228P) 骨架上的抗-CD138 VH 序列
453	构造到 IgG4 上、掺入铰链稳定化取代 S228P 的抗-HLA VH 序列
454	构造到 IgG4 上、掺入铰链稳定化取代 S228P 并且缺失第 553 位的苏氨酸残基(即干扰素序列中的 T106)的 A10.21VH 序列
455	A10.21 IgG4 IFNa2b
456	A10.21 IgG4 IFNa2b
457	A10.21 IgG4 IFNa2b
458	A10.21 IgG4 IFNa2b
459	A10.21 IgG4 IFNa2b
460	A10.21 IgG4 IFNa2b
461	A10.21 IgG1 IFNa2b
462	A10.21 IgG1 IFNa2b
463	A10.21 IgG1 IFNa2b
464	A10.21 IgG1 IFNa2b
465	A10.21 IgG2 IFNa2b
466	A10.21 IgG2 IFNa2b
467	A10.43 IgG4 IFNa2b
468	R10A2 IgG4 IFNa2b
469	A10.152 IgG4 IFNa2b
470	A02.12 IgG4 IFNa2b
471	抗-CD138 IgG4 IFNa2b

[0237]

SEQ ID NO:	分子
472	抗-HLA IgG4 IFN
473	A10.21 和 A10.43 轻链
474	R10A2 轻链
475	A10.21 IgG1 IFN
476	A02.12 lambda 轻链
477	抗-CD138 轻链
478	抗-HLA 轻链
479	A10.21 IgG4 (S228P) IFN (A145D, T106A)
480	IFN alpha-2-beta
481	掺入 S228P 的 IgG2 形式的 10.21 的多核苷酸
482	掺入 S228P 的 IgG4 形式的 10.43 的多核苷酸序列
483	掺入 S228P 的构造成 IgG4 的 2.12 的多核苷酸
484	掺入 S228P 的构造成 IgG4 的 R10A2 的多核苷酸
485	R10A2 VK 的多核苷酸序列
486	用于产生抗体 10.21 和抗体 10.43 的 VK 的多核苷酸序列
487	掺入 S228P 的构造成 IgG4 的 10.152 的多核苷酸序列
488	10.152 轻链的氨基酸序列
489	10.152 轻链的多核苷酸序列
490	2.12 轻链的多核苷酸序列
491	抗-CD138 kappa 轻链的多核苷酸序列
492	抗-CD138 IgG4 (S228P) 的多核苷酸序列
493	抗-HLA IgG4 (S228P) 的多核苷酸序列
494	抗-HLA VK 的多核苷酸序列
495	构造成 IgG1 的 10.21 的多核苷酸序列
496	10.21 IgG2 的多核苷酸序列
497	10.21 IgG3 的多核苷酸序列
498	包含减弱突变 A145X 的糖基化 (T106T) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y 的任何氨基酸
499	包含减弱突变 R144X 的糖基化 (T106T) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 A, D, E, G, H, I, K, L, N, Q, S, T, V, Y 的任何氨基酸
500	包含减弱突变 R33X 的糖基化 (T106T) 人干扰素 $\alpha$ -2-b, 其中 X 可以是选自 K, A, Q 的任何氨基酸

[0238]

SEQ ID NO:	分子
501	包含第 106 位氨基酸的缺失并且 d 包含减弱突变 A144X 的人干扰素 α-2-b , 其中 X 可以是选自 D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, Y 的任何氨基酸
502	掺入取代 M255Y, S257T, T259E 并且构造成 IgG1 的 10.21 的 VH 序列
504	抗-CD38 VH
505	抗-CD38 VL
506	抗-CD38 重链 (h10A2-hIgG4)
507	抗-CD38 轻链
508	抗-CD38 重链 IFN A145D (h10A2-hIgG4)
509	抗-CD 47 轻链
510	抗-CD47 重链
511	抗-CD38 VH 共有序列
512	抗-CD38 VL 共有序列
513	B6.H12 抗-CD47 轻链
514	B6.H12 抗-CD47 重链
515	N297A B6.H12 抗-CD47 轻链
516	N297A B6.H12 抗-CD47 重链
517	N297A 2A1 抗-CD47 轻链
518	N297A 2A1 抗-CD47 重链
519	N297A 5F9 抗-CD47 轻链
520	N297A 5F9 抗-CD47 重链
521	HB95 轻链
522	HB95 S228P IgG4 抗-HLA IFNa2b A145D 重链
523	抗-CD52 轻链
524	抗-CD52 S228P IgG4 IFNa2b A145D 重链
525	抗-CD20 轻链
526	抗-CD20 S228P IgG4 IFNa2b A145D 重链
527	16C4 抗-CD19 轻链
528	16C4 S228P IgG4 抗-CD19 IFNa2b A145D 重链
529	EpAb2 抗-EpCAM 轻链
530	EpAb2 S228P IgG4 抗-EpCAM IFNa2b A145D 重链
531	抗-CD38 N297A IFNa2b A145D 重链

[0239]

SEQ ID NO:	分子
532	<b>抗-CD38 重链 IgG4 S228P IFNa2b T106A A145D</b>
533	<b>抗-CD38 轻链</b>
[0240]	<b>抗-CD47 重链 非糖基化</b>
	<b>抗-CD47 VL</b>
	<b>IFNa2b T106A A145D</b>
	<b>抗-CD52 S228P IgG4 重链</b>
	<b>抗-CD38 VL</b>

[0241] 本发明涉及以下实施方案：

[0242] 1. 一种用于治疗受试者中的肿瘤的组合疗法,所述组合疗法包括施用(i)多肽构建体,所述多肽构建体包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN),所述抗体结合在肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原,并且包含功能性Fc区,和(ii)CD47拮抗剂,其抑制CD47与SIRPa受体的相互作用。

[0243] 2. 如实施方案1所述的联合疗法,其中减弱的I型IFN通过肽键与抗体连接。

[0244] 3. 如实施方案1或2所述的联合疗法,其中减弱的I型IFN直接地或通过长度为1-20个氨基酸的接头与抗体连接。

[0245] 4. 如实施方案1至3中任一项所述的组合疗法,其中所述肽或多肽信号传导配体与所述抗体的轻链或重链恒定区的C末端连接。

[0246] 5. 如实施方案1至4中任一项所述的联合疗法,其中减弱的I型IFN是减弱的IFN $\alpha$ 。

[0247] 6. 如实施方案5所述的联合疗法,其中IFN $\alpha$ 的氨基酸序列选自SEQ ID NOS 1至3、80至90、391和392,并且其中IFN $\alpha$ 包含减弱IFN $\alpha$ 活性的至少一个氨基酸取代或缺失。

[0248] 7. 如实施方案5或6所述的联合疗法,其中减弱的IFN $\alpha$ 是减弱的IFN $\alpha$ 2b。

[0249] 8. 如实施方案7所述的联合疗法,其中减弱的IFN $\alpha$ 2b具有相对于SEQ ID NO:3包含至少一个选自下述的氨基酸取代或缺失的序列:L15A,R22A,R23A,S25A,L26A,F27A,L30A,L30V,K31A,D32A,R33A,R33K,R33Q,H34A,Q40A,D114R,L117A,R120A,R120E,R125A,R125E,K131A,E132A,K133A,K134A,M148A,R149A,S152A,L153A,N156A,(L30A,H57Y,E58N和Q61S),(R33A,H57Y,E58N和Q61S),(M148A,H57Y,E58N和Q61S),(L153A,H57Y,E58N和Q61S),(R144A,H57Y,E58N和Q61S),(N65A,L80A,Y85A和Y89A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和D114A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和L117A),(N65A,L80A,Y85A,Y89A和R120A),(Y85A,Y89A和D114A),(D114A和R120A),(L117A和R120A),(L117A,R120A和K121A),(R120A和K121A),(R120E和K121E),第144位的R取代为A,D,E,G,H,I,K,L,N,Q,S,T,V或Y,第145的A取代为D,E,G,H,I,K,L,M,N,Q,S,T,V或Y,缺失残基L161至E165及其组合。

[0250] 9. 如实施方案7-9中任一项所述的联合疗法,其中减弱的IFN $\alpha$ 2b是非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b。

[0251] 10. 如实施方案10所述的联合疗法,其中非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b的T106缺失或被除T以外的氨基酸取代。

[0252] 11. 如实施方案11所述的联合疗法,其中非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b的T106被A取代。

- [0253] 12. 如实施方案11所述的联合疗法,其中缺失了非糖基化的减弱的IFN $\alpha$ 2b的T106。
- [0254] 13. 如实施方案7或8所述的联合疗法,其中减弱的IFN $\alpha$ 2b的序列是SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:536。
- [0255] 14. 如实施方案1-13中任一项所述的联合疗法,其中所述细胞表面相关抗原选自CD38, CD138, RANK配体, HM1.24, CD56, CS1, CD20, CD74, IL-6R, Blys (BAFF), BCMA, Kininogen, beta2微球蛋白, FGFR3, ICAM-1, matriptase, CD52, EGFR, GM2,  $\alpha$ 4整合素, IFG-1R, KIR, CD3, CD4, CD8, CD24, CD30, CD37, CD44, CD69, CD71, CD79, CD83, CD86, CD96, HLA, PD-1, ICOS, CD33, CD115, CD11c, CD19, CD52, CD14, FSP1, FAP, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , ASGR1, ASGR2, FSP1, LyPD3, RTI140/Ti- $\alpha$ , HTI156, VEGF受体, CD241, RCHE基因的产物, CD117 (c-kit), CD71 (转铁蛋白受体), CD36 (血小板反应蛋白受体), CD34, CD45RO, CD45RA, CD115, CD168, CD235, CD236, CD237, CD238, CD239, CD240, TROP2, CD70, CCR2, HER2, EGFR和CCR3。
- [0256] 15. 如实施方案1-14中任一项所述的联合疗法,其中所述细胞表面相关抗原选自CD38, CD138, EpCAM, TROP2, CD19, CD20, CD79b, CD22和CD52。
- [0257] 16. 如实施方案15所述的联合疗法,其中细胞表面相关抗原是CD38。
- [0258] 17. 如实施方案16所述的联合疗法,其中抗体的V<sub>H</sub>序列选自SEQ ID Nos:342, 344, 346, 504和511。
- [0259] 18. 如实施方案16或17所述的联合疗法,其中抗体的V<sub>L</sub>序列选自SEQ ID Nos:341, 343, 345, 505, 512, 535和538。
- [0260] 19. 如实施方案1-18中任一项所述的联合疗法,其中多肽构建体的序列是SEQ ID NO:508和SEQ ID NO:507或SEQ ID NO:532和SEQ ID NO:533。
- [0261] 20. 如实施方案1-19中任一项所述的联合疗法,其中CD47拮抗剂结合CD47并抑制其与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。
- [0262] 21. 如实施方案20所述的联合疗法,其中CD47拮抗剂是抗CD47抗体。
- [0263] 22. 如实施方案21所述的联合疗法,其中抗CD47抗体是人抗体或人源化单克隆抗体。
- [0264] 23. 如实施方案21或22所述的联合疗法,其中抗CD47抗体是非糖基化的。
- [0265] 24. 如实施方案21所述的联合疗法,其中轻链的序列是SEQ ID NO:509, 重链的序列是SEQ ID NO:510或SEQ ID NO:534。
- [0266] 25. 如实施方案20所述的联合疗法,其中CD47拮抗剂是抗SIRP $\alpha$ 抗体。
- [0267] 26. 如实施方案25所述的联合疗法,其中抗SIRP $\alpha$ 抗体是人抗体或人源化单克隆抗体。
- [0268] 27. 如实施方案20所述的联合疗法,其中CD47拮抗剂是SIRP $\alpha$ 的细胞外结构域。
- [0269] 28. 如实施方案27所述的联合疗法,其中SIRP $\alpha$ 的细胞外结构域与Fc连接。
- [0270] 29. 如实施方案1至28中任一项所述的联合疗法,其中组分(i)和(ii)顺序或同时给药。
- [0271] 30. 一种治疗受试者中肿瘤的方法,包括如实施方案1至29中任一项所述的组合疗法。
- [0272] 31. 根据实施方案30的治疗受试者中肿瘤的方法,其中肿瘤选自多发性骨髓瘤或非霍奇金淋巴瘤。

[0273] 32. 一种组合物,其混合包含(i)多肽构建体,所述多肽构建体包含与抗体连接的减弱的I型干扰素(IFN),所述抗体结合在肿瘤细胞上表达的细胞表面相关抗原并且包含功能性Fc区,和(ii)CD47拮抗剂,其抑制CD47与SIRP $\alpha$ 受体的相互作用。

[0274] 33. 实施方案1至28中任一项的组合疗法的组分(i)和(ii)在制备用于治疗肿瘤的药物中的用途。

## NCI-H929 骨髓瘤异种移植物模型

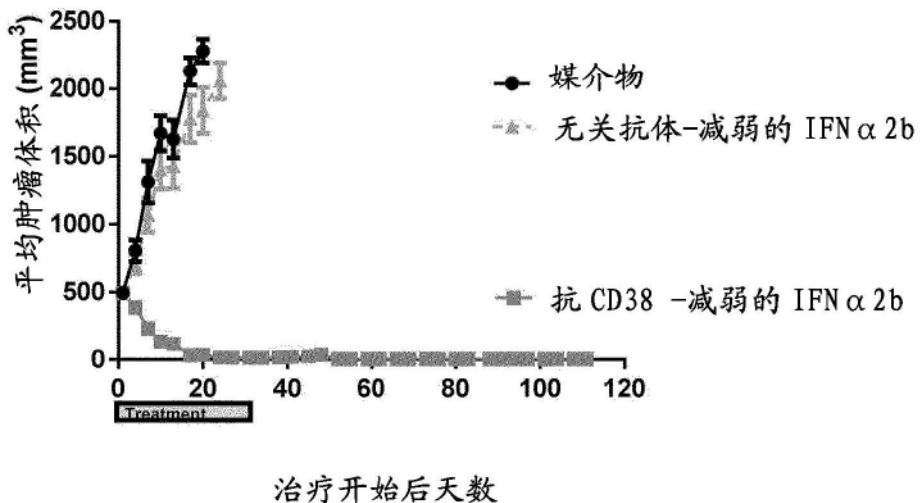


图1

## NCI-H929 骨髓瘤异种移植物模型

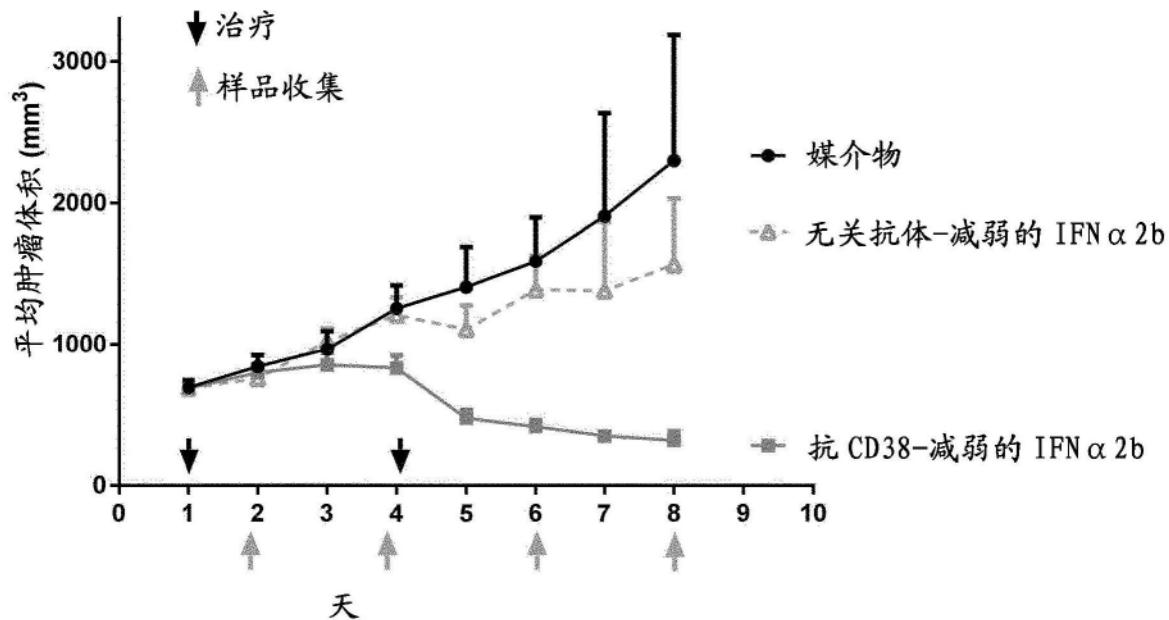


图2A

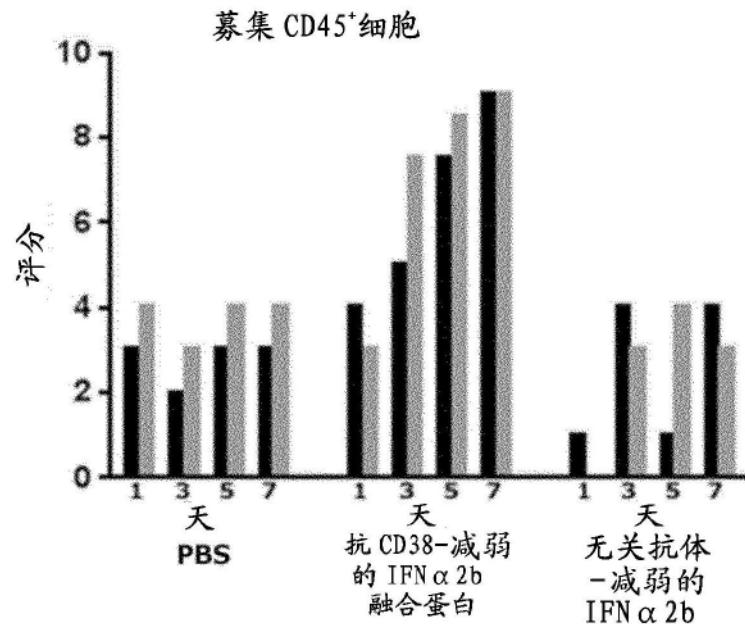


图2B

## 786-0 肾细胞癌异种移植植物模型

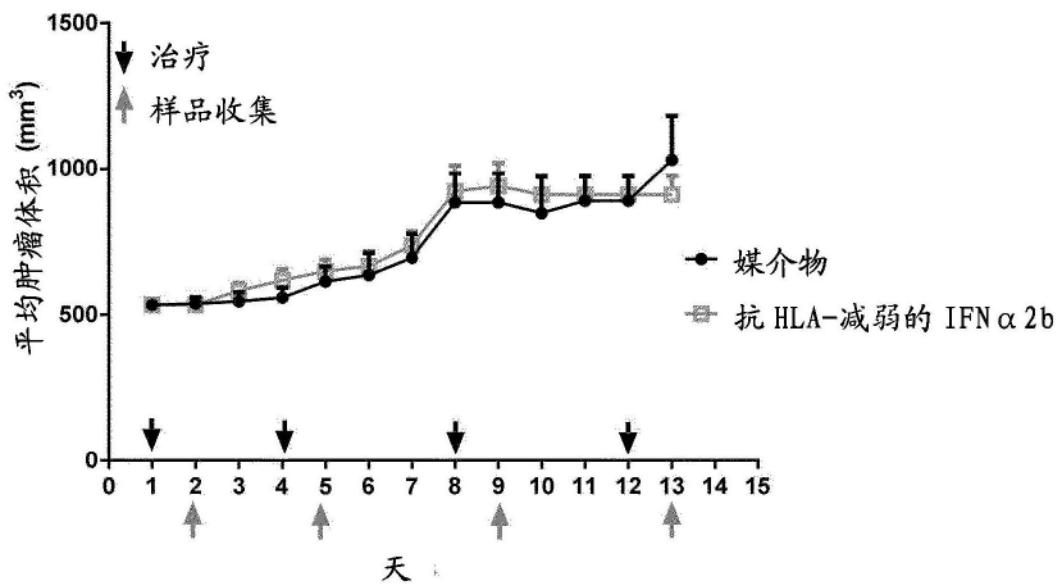


图3A

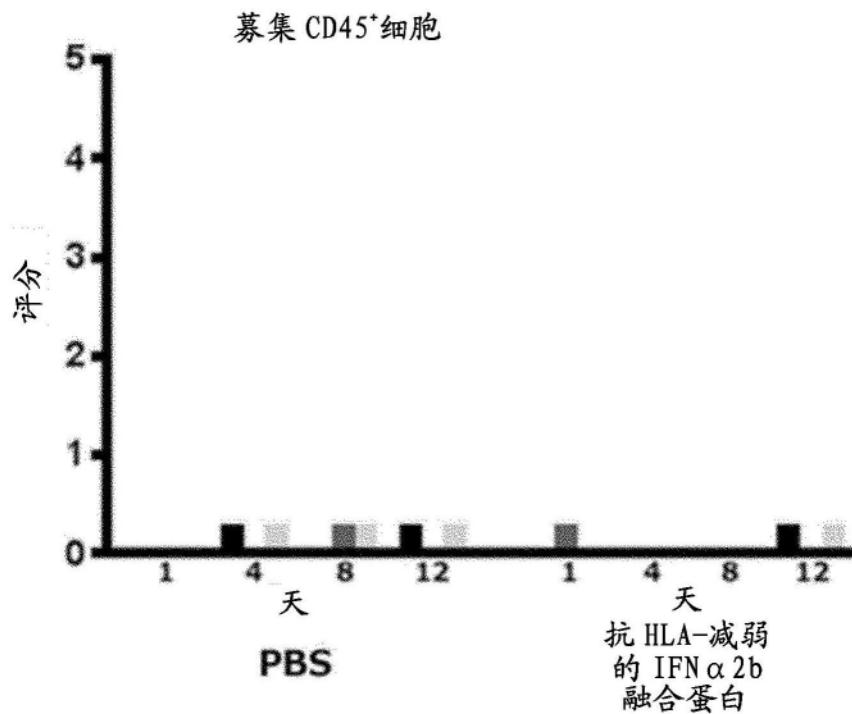


图3B

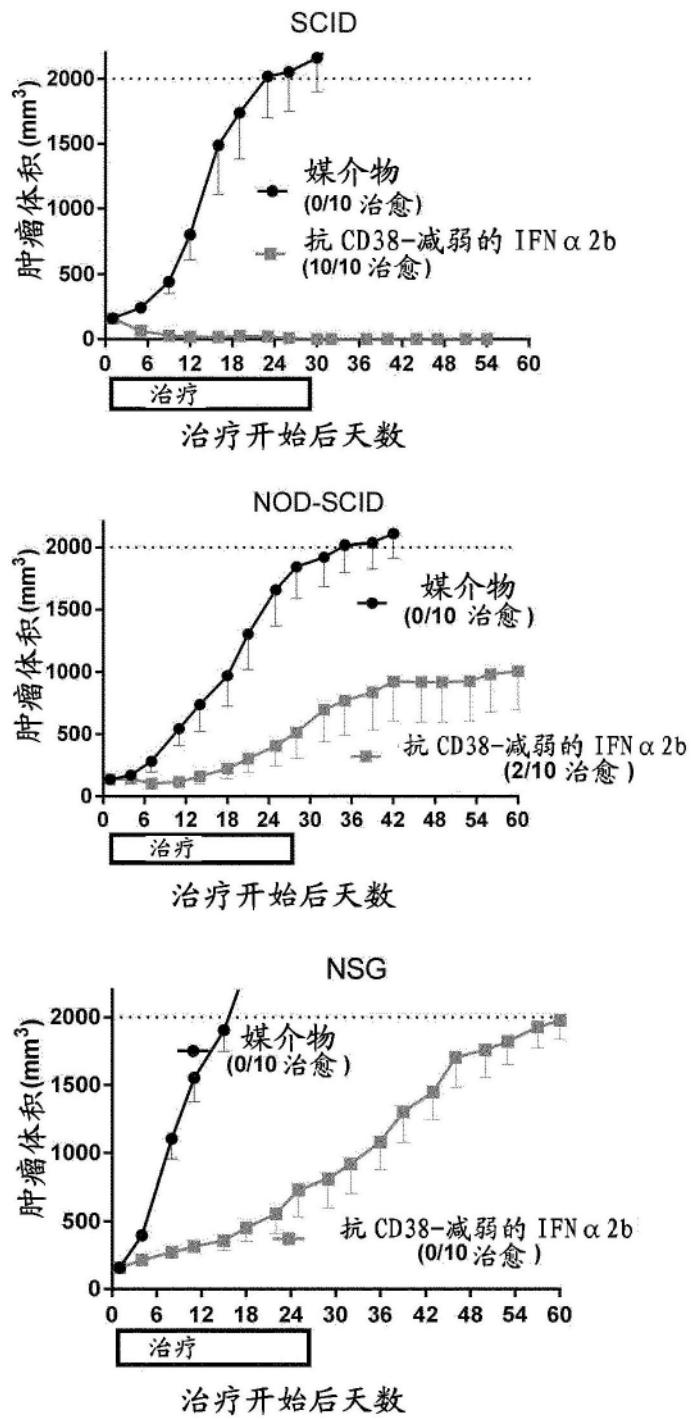


图4

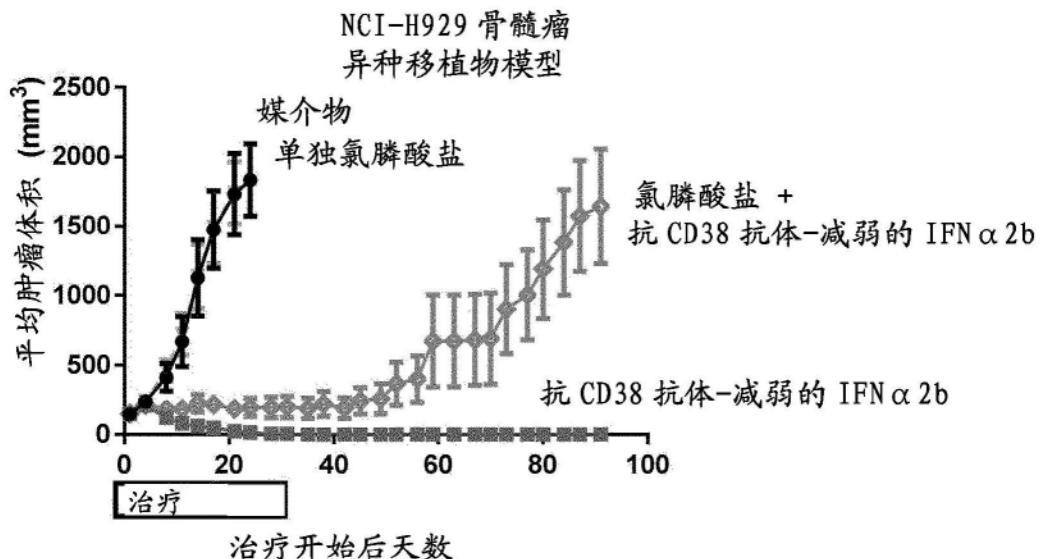


图5

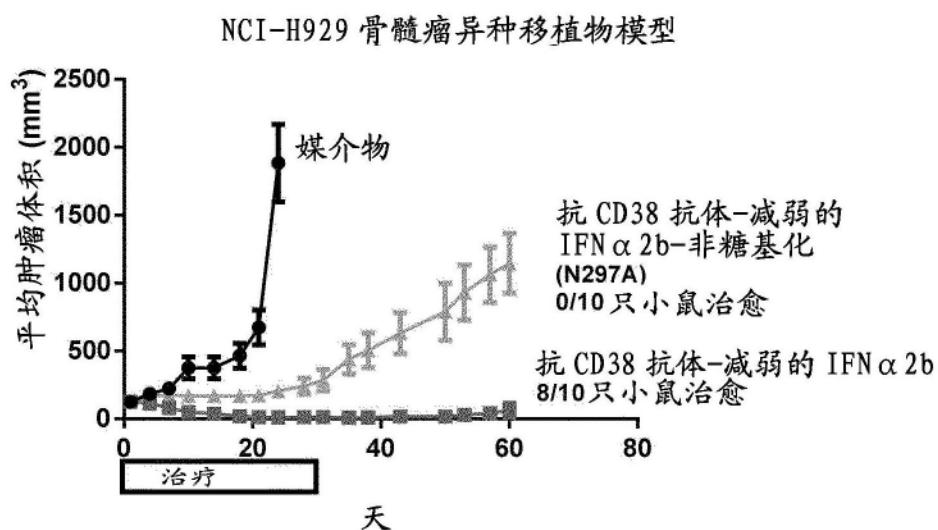


图6

## NCI-H929 骨髓瘤异种移植模型

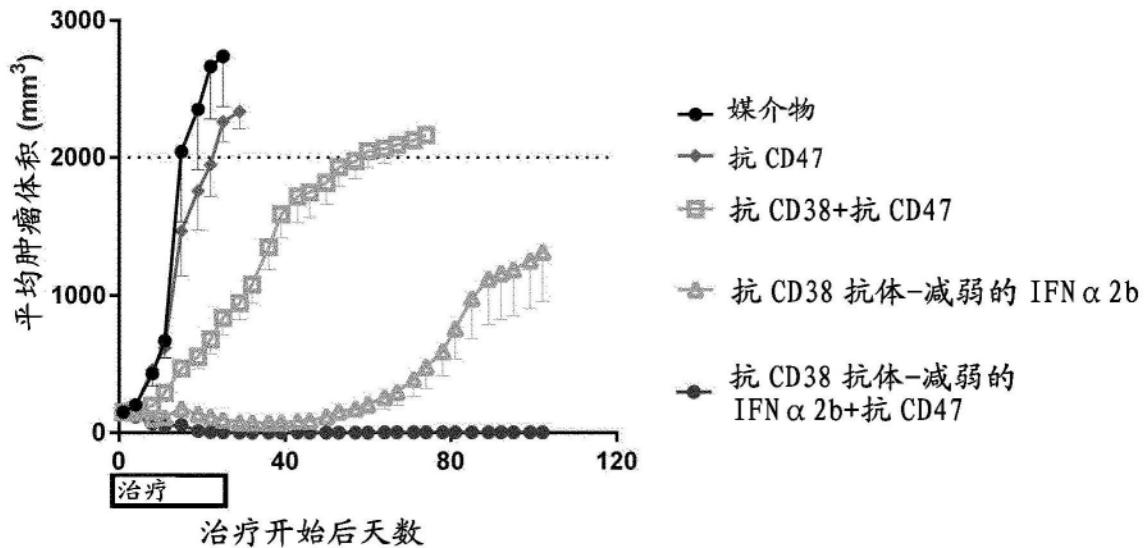


图7

## RPMI 8226 骨髓瘤异种移植模型

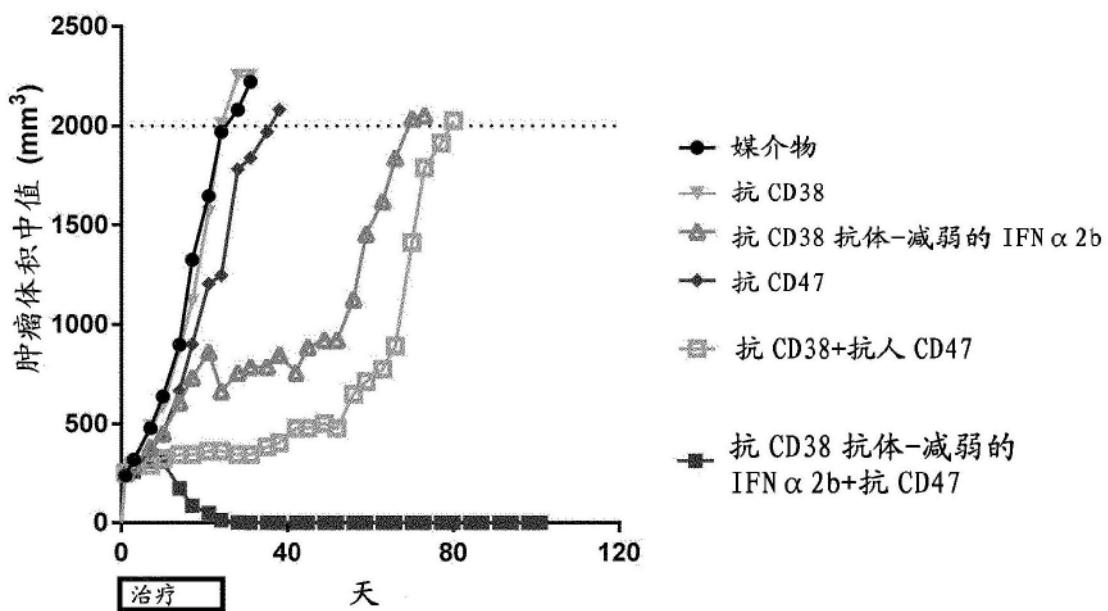


图8

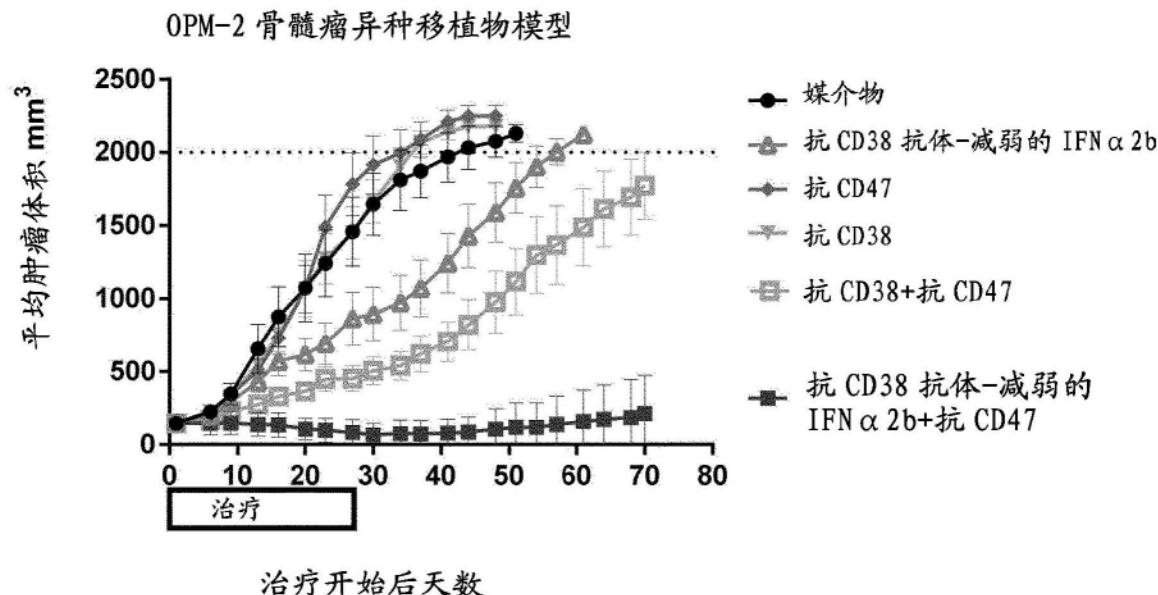


图9

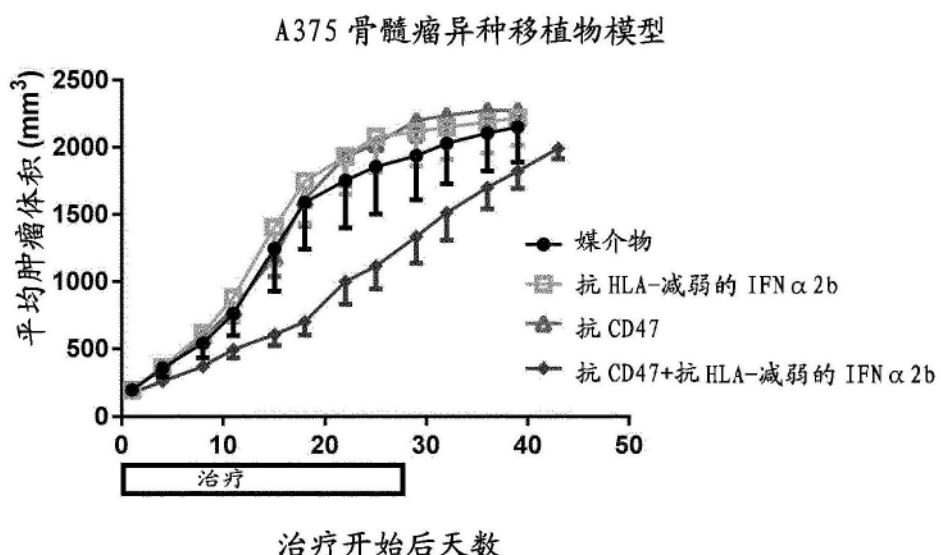


图10

## ARP-1 骨髓瘤异种移植物模型

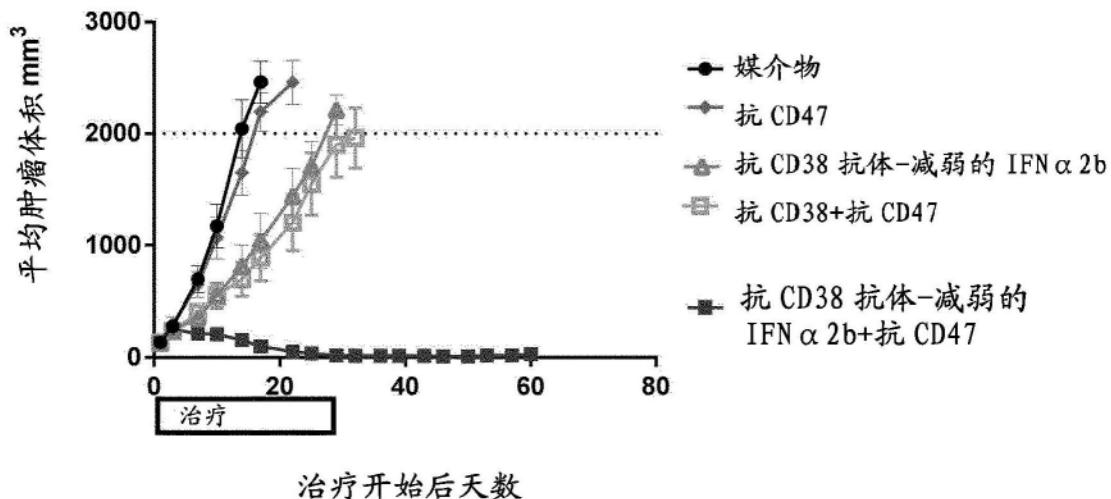


图11

## ARP-1 骨髓瘤异种移植物模型

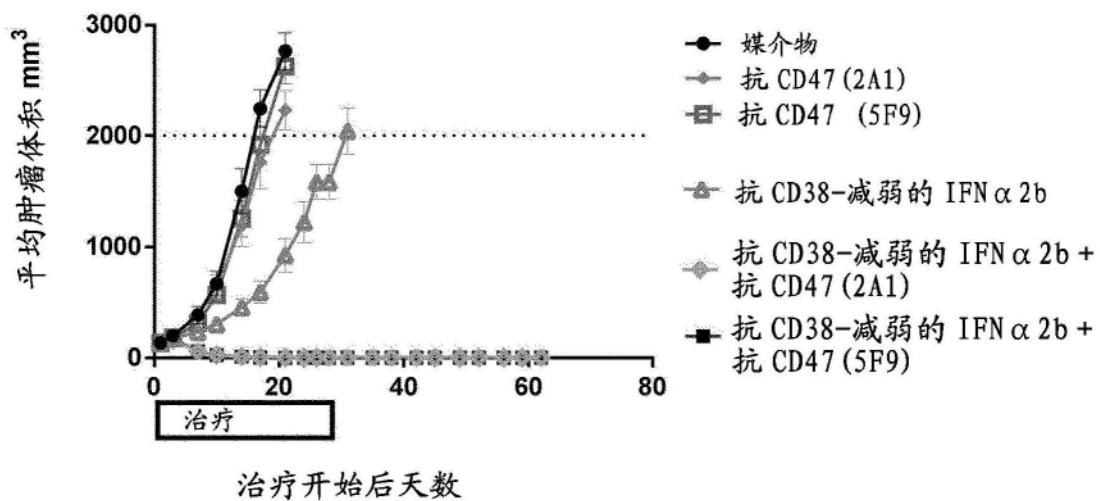


图12

## HC-1 毛细胞白血病异种移植模型

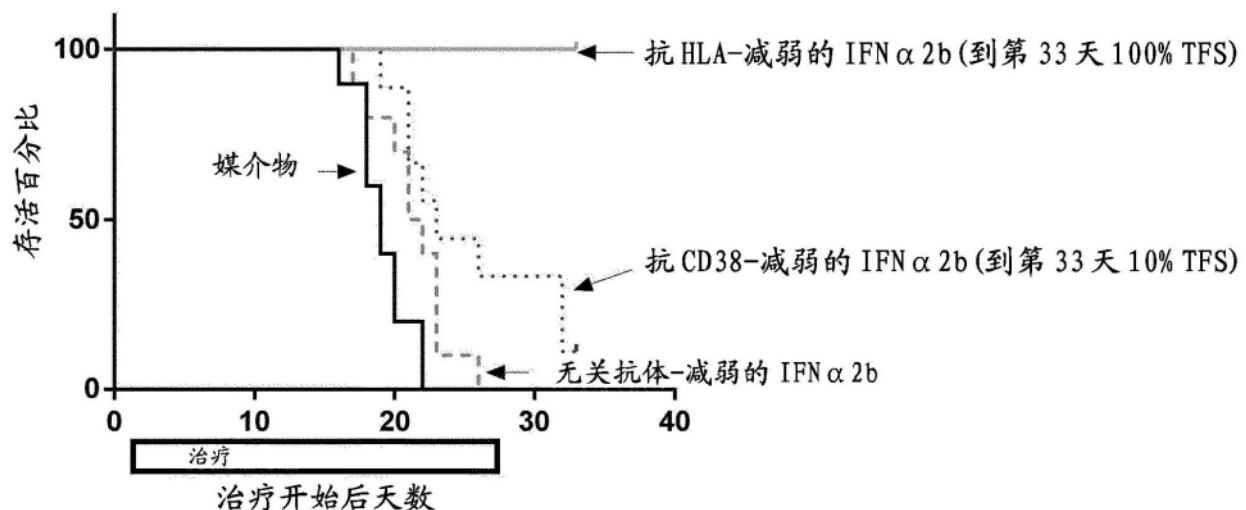


图13A

## HC-1 毛细胞白血病异种移植模型

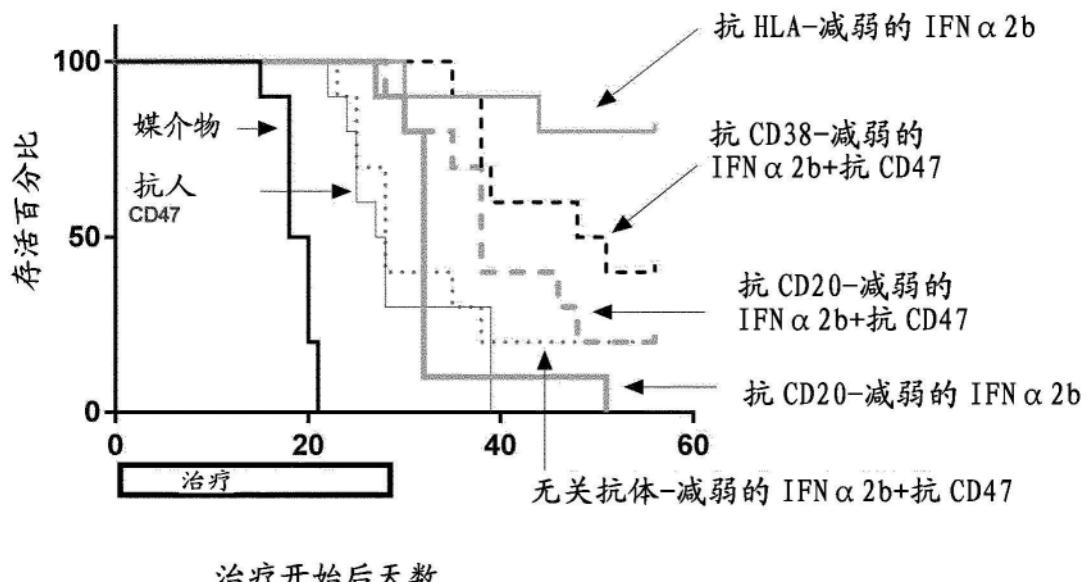


图13B

## CCRF CEM T ALL 异种移植植物模型

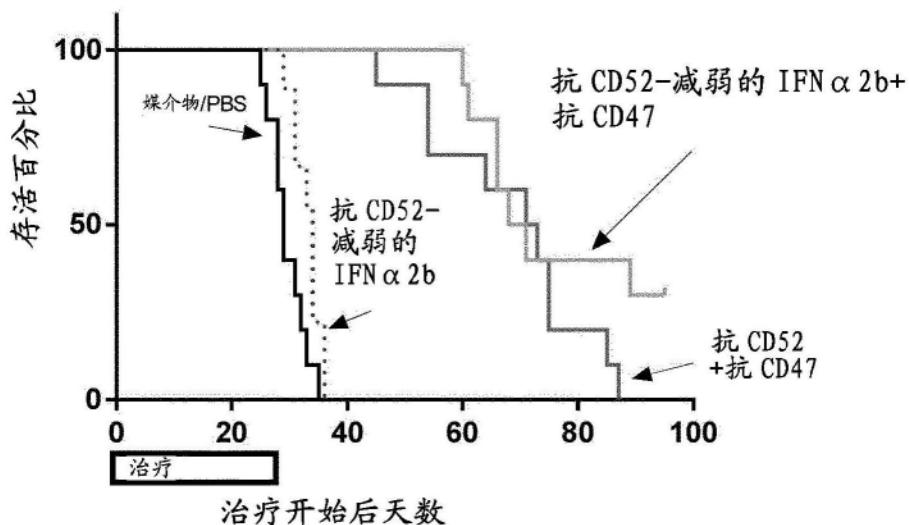


图14

## MEC1 B CLL 异种移植植物模型

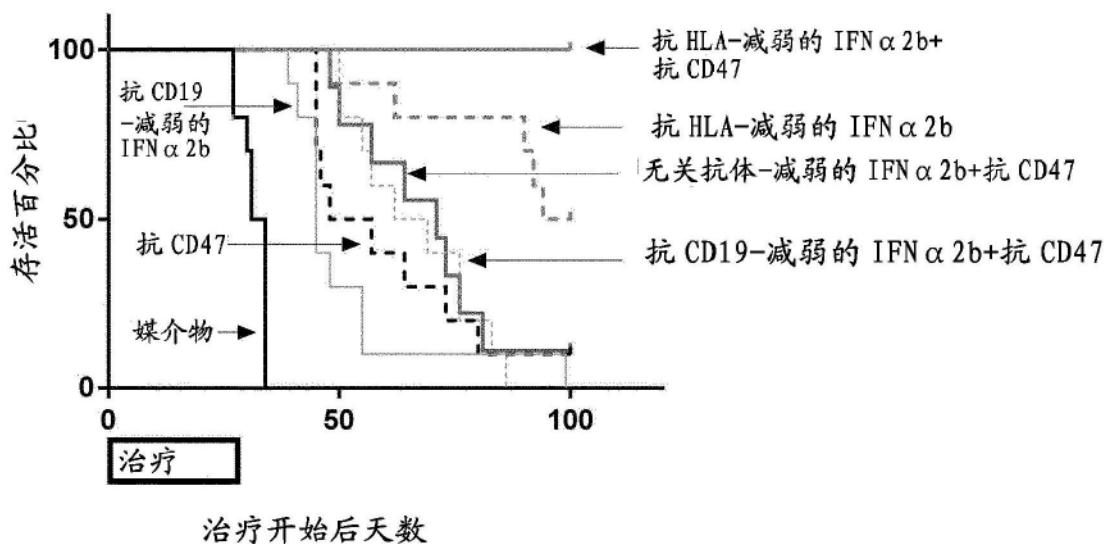


图15

## H820 肺异种移植物模型

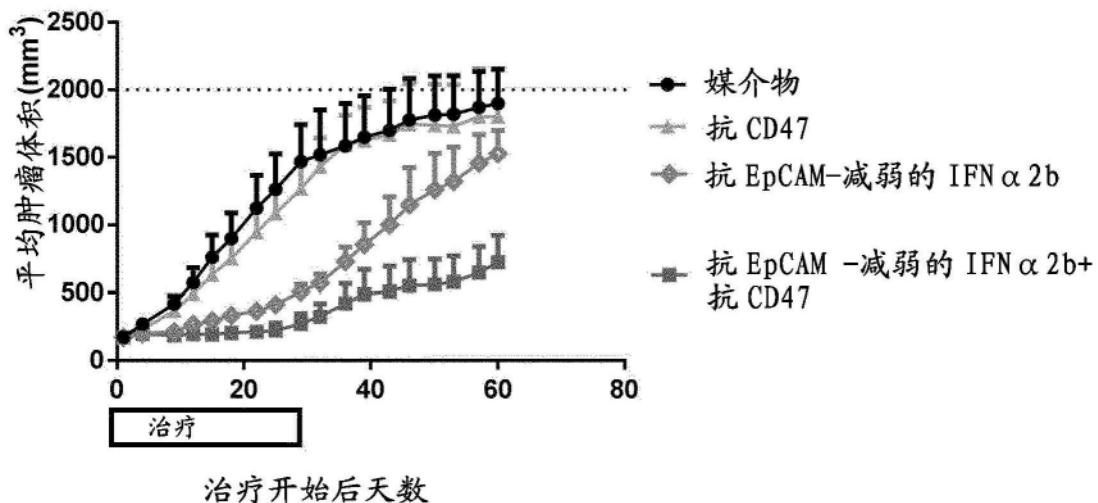


图16

## OPM2 MM 异种移植物模型

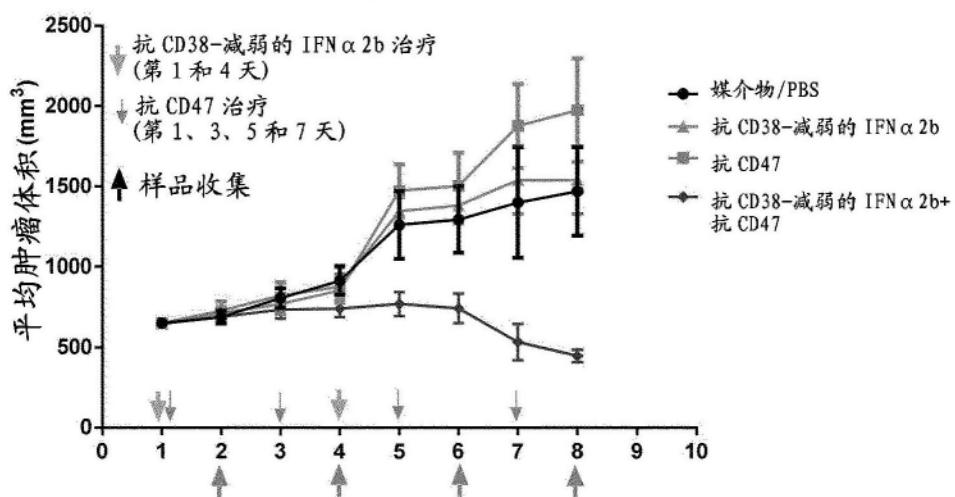


图17A

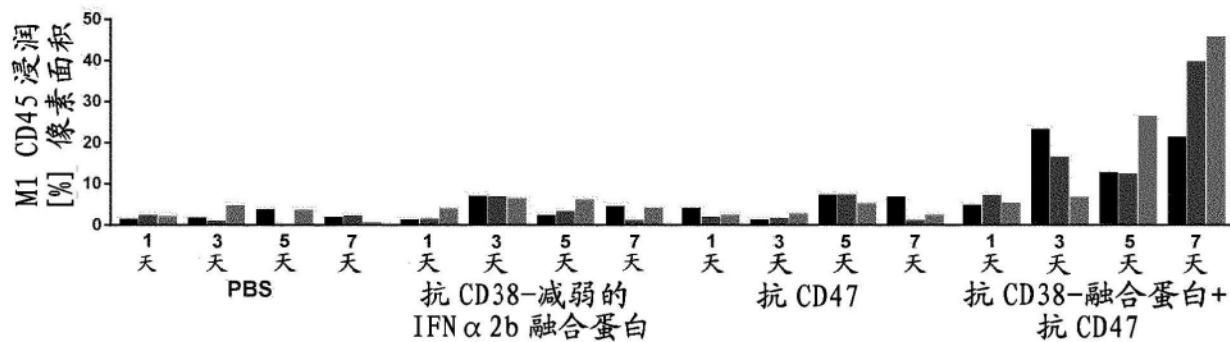
募集 CD45<sup>+</sup> 细胞

图17B

## H929 骨髓瘤 NOD-SCID 异种移植模型

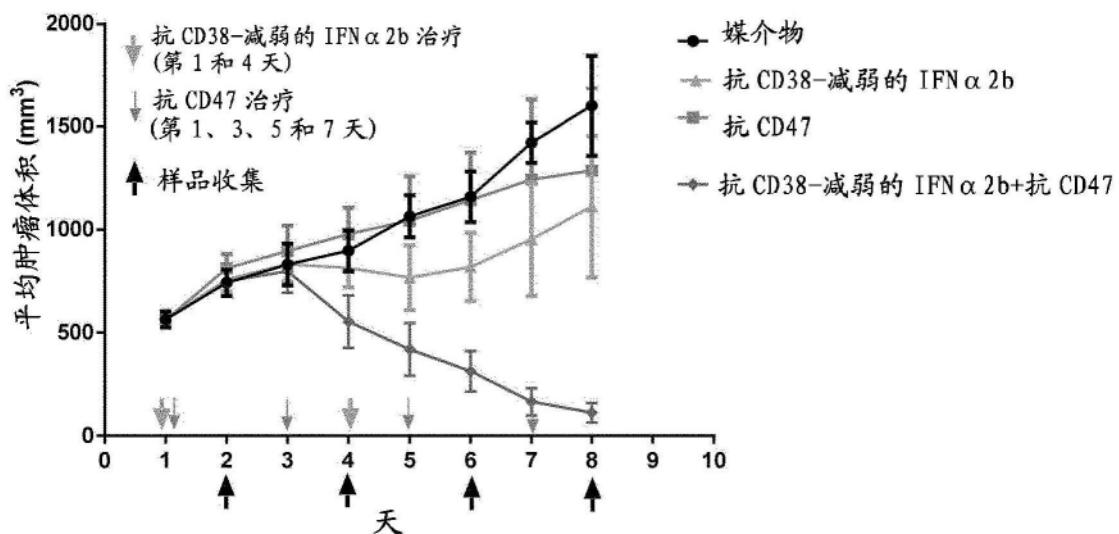


图18A

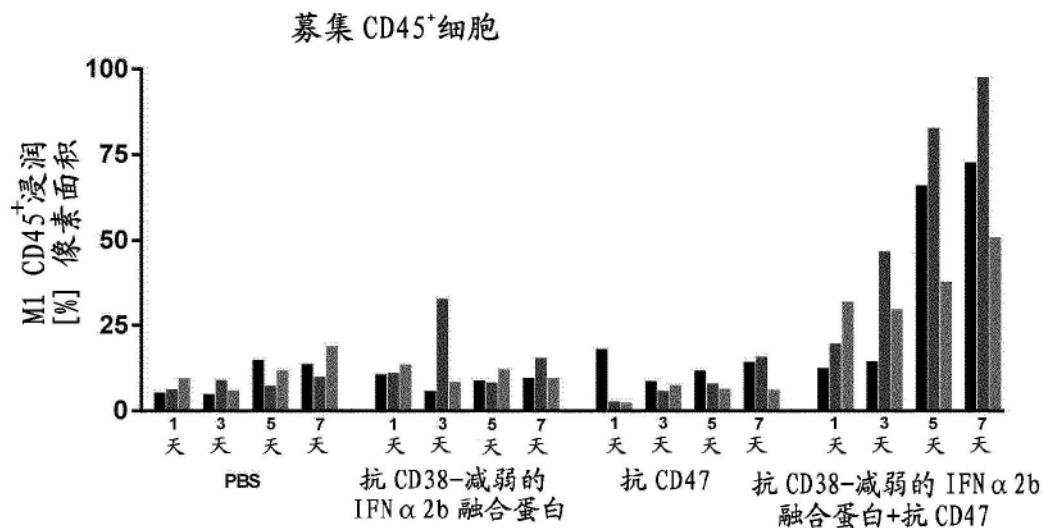


图18B